

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

Erika Sousa Guimarães

**Sinais nucleares de cálcio dependentes de inositol
1,4,5-trisfosfato são necessários para a angiogênese e
migração celular em tumores de mama triplo-
negativos**

Belo Horizonte

2016

Erika Sousa Guimarães

**Sinais nucleares de cálcio dependentes de Inositol
1,4,5-trisfosfato são necessários para a angiogênese e
migração celular em tumores de mama triplo-
negativos**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Escola de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Maria de Fátima Leite

Belo Horizonte

2016

Guimarães, Erika Sousa.
G963s Sinais nucleares de cálcio dependentes de inositol 1,4,5-trisfosfato são necessários para a angiogênese e migração celular em tumores de mama triplo-negativos [manuscrito]. / Erika Sousa Guimarães. - - Belo Horizonte: 2016
91f.: il.
Orientador: Maria de Fátima Leite.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Sinalização do Cálcio. 2. Cálcio. 3. Neoplasias de Mama Triplo Negativas. 4. Inibidores de Angiogênese. 5. Movimento Celular. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Leite, Maria de Fátima. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.
NLM: QU 55.2

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Sinalização de Cálcio, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta tese contou com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

“Most people say that it is the intellect which makes a great scientist.

They are wrong: it is character”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Maria de Fátima Leite, pela oportunidade única. Obrigada por ter acreditado em mim, desde o primeiro momento.

Ao Rodrigo, à Clarissa e à Andressa por me ensinarem, todos os dias. São de vocês meus melhores momentos nesses anos, sem sombra de dúvidas. Obrigada por todo o apoio e por estarem ao meu lado sempre.

Ao André, por ter sido meu apoio constante. Obrigada pelo carinho, pelo respeito e por ter dividido comigo os ensinamentos que trago comigo hoje e que levarei pra sempre.

Aos colegas do laboratório de Sinalização de Cálcio, novos e antigos, pelo companheirismo e pela amizade.

Ao Taquinho, obrigada pelo carinho e por toda a ajuda.

A todos os laboratórios e professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica que me receberam sempre com tanto respeito. Obrigada pela compreensão e pelas discussões e contribuições ao longo de todos esses anos.

À minha família, pelo incentivo, pela compreensão e pelo amor que não cansa nunca. Ao Frederico e à Dé, por toda a compreensão, pelo cuidado e pelo apoio. Obrigada por tornarem esses anos mais fáceis e mais completos.

Ao programa de pós-graduação em Medicina Molecular.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Obrigada.

RESUMO

RESUMO

O íon cálcio regula uma grande variedade de funções celulares. Nesse sentido, o compartimento intracelular onde o aumento de cálcio ocorre na célula é um dos parâmetros determinantes para a codificação do sinal em uma resposta celular específica. Assim, aumentos na concentração do cálcio nuclear produzem resultados biológicos que diferem dos efeitos desse íon no citoplasma. É amplamente sabido que o cálcio especificamente nuclear regula o ciclo celular e a proliferação de células tumorais; entretanto, o seu envolvimento no desenvolvimento tumoral ainda não é completamente entendido. No presente trabalho, a participação do cálcio nuclear no progresso de tumores de mama foi investigada. Nossos resultados mostraram que o crescimento *in vivo* do tumor primário foi significativamente comprometido após a redução do cálcio nuclear, em consequência do aumento da morte celular tumoral e da redução na taxa de proliferação das células tumorais. Além disso, nossos resultados mostram que o tamponamento do cálcio nuclear leva à redução da angiogênese tumoral, possivelmente em consequência à superregulação da expressão da quimiocina CXC induzida por interferon gama (CXCL10/IP10), um potente angiostático. Ainda, nossos resultados mostram que a redução dos sinais de cálcio nucleares também reduz a motilidade celular em células de tumores de mama triplo-negativo. De fato, após o tamponamento do cálcio nuclear, as células tumorais exibiram menor capacidade de migração e de invasão, resultantes, pelo menos em parte, do aumento da expressão de vinculina, um importante regulador da adesão celular. Investigações de novos alvos terapêuticos são especialmente importantes em câncer de mama triplo-negativo, devido à ausência de terapias específicas para esse subtipo. Nossos resultados mostram que o cálcio nuclear é essencial em diversas etapas do desenvolvimento tumoral e pode ser considerado uma estratégia promissora no tratamento de câncer de mama triplo-negativo.

Palavras-chave: Cálcio nuclear, câncer de mama triplo-negativo, angiogênese, migração.

ABSTRACT

ABSTRACT

Increases in nuclear calcium concentration generate specific biological outcomes that differ from those resulting from increased cytoplasmic calcium. Nuclear calcium effects on tumor cell proliferation are widely appreciated; nevertheless, its involvement in other steps of tumor progression is not well understood. Therefore, we evaluated whether nuclear calcium is essential in other additional stages of tumor progression, including key steps associated with the formation of the primary tumor or with the metastatic cascade. We found that nuclear calcium buffering impaired triple negative breast cancer growth not just by decreasing tumor cell proliferation, but also by enhancing tumor necrosis. Moreover, nuclear calcium regulates tumor angiogenesis through a mechanism that involves the upregulation of the anti-angiogenic C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10-IP10). In addition, nuclear calcium buffering regulates breast tumor cell motility, culminating in less cell invasion, likely due to enhanced vinculin expression, a focal adhesion structural protein. Together, our results show that nuclear calcium is essential for breast cancer angiogenesis and cell migration and can be considered as a promising strategic target for triple negative breast cancer therapy.

Keywords: Nuclear calcium, breast cancer, angiogenesis, cell migration.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca²⁺: Cálcio

IP3: Inositol 1,4,5-trisfosfato

DAPI: *4-6-diamino-2-phenylindole*

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

CXCL10/IP-10: Quimiocina CX induzida por Interferon Gama

RE: Retículo Endoplasmático

RyR: Receptores de Rianodina

IP3R: Receptores de Inositol 1,4,5-trisfosfato

RN: Retículo Nucleoplasmático

PKC: Proteína Cinase

CREB: Proteína de ligação a CRE

CBP: Proteína de ligação a CREB

ATCC: *American Type Culture Collection*

SBF: Soro Bovino Fetal

mRFP: Proteína Fluorescente Vermelha Monomérica

NLS: Sequência de Localização Nuclear

Ad-RFP: Construção Adenoviral Vazia

Fluo-4/AM: Fluo4-aceto-metil-éster

EGF: Fator de crescimento epidermal

RM: Ressonância Magnética

ROI: Região de Interesse

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

IH: Imunohistoquímica

BSA: Albumina Bovina

PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

BrdU: 5-bromo-2-deoxiuridina

IMF: Imunofluorescência

RNASeq: Sequenciamento completo de RNA

WB: *Immunoblots*

RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de Progesterona

HER2: Receptor de Crescimento Epidermal Humano

u.a.: Unidades Arbitrárias

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tamponamento de IP3R reduz os sinais de Ca^{2+} no núcleo das células tumorais.

Figura 2: Redução do tumor primário após tamponamento do Ca^{2+} nuclear *in vivo*.

Figura 3: Redução do volume do tumor primário após tamponamento do Ca^{2+} nuclear *in vivo*.

Figura 4: Redução do Ca^{2+} nuclear causa o aumento da morte das células tumorais *in vivo*.

Figura 5: Redução da proliferação das células tumorais após tamponamento do Ca^{2+} nuclear.

Figura 6: Redução do índice de perfusão sanguíneo tumoral após redução do Ca^{2+} nuclear.

Figura 7: O tamponamento do Ca^{2+} nuclear leva a redução do número de vasos sanguíneos *in vivo*.

Figura 8. O tamponamento do Ca^{2+} nuclear altera a expressão gênica em células de tumores de mama.

Figura 9: Via envolvendo os principais genes regulados pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear e envolvidos em angiogênese.

Figura 10: O tamponamento do Ca^{2+} nuclear leva à superregulação de CXCL10.

Figura 11: Ca^{2+} nuclear altera a capacidade de migração em células de câncer de mama.

Figura 12: Redução do Ca^{2+} nuclear diminui a motilidade e a invasividade em células de câncer de mama.

Figura 13: O tamponamento de Ca^{2+} nuclear altera a morfologia das células durante a migração.

Figura 14: Adesão focal aumenta nas células tumorais após redução do Ca^{2+} nuclear.

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais genes com expressão regulada para cima (*upregulated*) após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear.

Tabela 2: Principais genes com expressão regulada para baixo (*downregulated*) após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	28
Objetivo Geral	28
Objetivos Específicos	28
MATERIAIS E MÉTODOS	30
Cultura Celular	30
Animais.....	30
Construção Tamponadora de Ca ²⁺ Nuclear	30
Medidas de Ca ²⁺ Nuclear	31
Desenho Experimental <i>in vivo</i>	32
Avaliação do Desenvolvimento Tumoral	32
Índice de Perfusão Tumoral.....	33
Quantificação da Densidade Vascular Tumoral.....	33
Análise da Área de Morte Celular	34
Avaliação de Proliferação Celular	34
Curva de Proliferação.....	35
Medidas de Incorporação de BrdU.....	35
Ensaio de <i>Wound Healing</i>	35
<i>Tracking</i> Celular.....	36
Ensaio de Invasão em Matrigel	36
Análise da Morfologia Celular	37
Imunofluorescência para Adesão Focal	37
Sequenciamento de RNA	38
Construção de Via de Angiogênese	38
Ensaio de Imunoblot.....	39
Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)	40
Ensaio de ELISA para Dosagem de CXCL10	41
Análise Estatística	41
RESULTADOS	43
O tamponamento de IP3R reduz de forma eficiente os sinais de Ca ²⁺ no núcleo das células	43

A redução do Ca ²⁺ nuclear induz o aumento da morte das células tumorais <i>in vivo</i>	48
O tamponamento do Ca ²⁺ nuclear reduz a proliferação das células tumorais <i>in vitro</i> ...	50
Redução do Ca ²⁺ nuclear nas células tumorais leva à redução do índice de perfusão sanguínea tumoral	52
O tamponamento do Ca ²⁺ nuclear altera a expressão gênica em células de tumores de mama	55
O tamponamento do Ca ²⁺ nuclear leva à superregulação de CXCL10	64
O tamponamento do Ca ²⁺ nuclear reduz a migração e a invasão celulares em tumores de mama triplo-negativos	66
Redução do Ca ²⁺ nuclear aumenta a expressão de vinculina, parte do complexo de adesão focal celular	70
DISCUSSÃO	73
CONCLUSÃO	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
PERSPECTIVAS	83

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um dos cânceres malignos mais comuns e o câncer mais frequente entre mulheres [1]. É considerado uma doença heterogênea, dividida em quatro subtipos de acordo com seu perfil molecular: (i) luminal A, (ii) luminal B, (iii) HER²⁺ e (iv) basal [2-4]. Cânceres de mama triplo-negativos associam-se com o subtipo basal e são definidos por diagnóstico de exclusão como tumores que não possuem expressão de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e sem a superexpressão do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 HER2 [5]. Cânceres de mama triplo-negativos correspondem a 10-17% de todos os carcinomas mamários e são considerados os tumores menos susceptíveis à quimioterapia e os mais agressivos entre todos os subtipos: possuem o pior prognóstico, a pior taxa de sobrevivência e o menor tempo de recidiva em comparação a tumores não-negativos [6-9]. Com relação à terapia, a cirurgia é o tratamento primário para pacientes com câncer de mama em estágios iniciais e a quimioterapia é a única forma sistêmica de tratamento para esse subtipo. Entretanto, tratamentos não-cirúrgicos são associados a significativa toxicidade e um amplo espectro de efeitos colaterais que afetam a vida do paciente substancialmente. Nesse sentido, a busca por novos alvos terapêuticos para esse subtipo torna-se extremamente relevante.

O cálcio (Ca²⁺) é um mensageiro intracelular responsável por controlar simultaneamente diversos processos celulares, incluindo aqueles de curta duração, como contração e secreção, bem como respostas de longa duração, como transcrição gênica, proliferação e morte celulares [10]. Por isso, a sinalização de Ca²⁺ é crucial durante toda a vida: em mamíferos, durante a fertilização, sinais regulares de Ca²⁺ persistem por algumas horas e iniciam o desenvolvimento, dirigidos pela liberação de Ca²⁺ via receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3R) [11]. À medida que o embrião se aproxima mitose, transientes na sinalização de Ca²⁺ controlam a iniciação de diversos eventos mitóticos, como a quebra do envelope nuclear [12] e a clivagem celular [13]. Mais tardiamente no desenvolvimento, o Ca²⁺ é responsável por induzir a diferenciação em diversas células, incluindo células neuronais e musculares [14]. Após a diferenciação, algumas células mantêm sua capacidade de entrar novamente no ciclo celular, geralmente em resposta a um fator de crescimento. Nesse sentido, o Ca²⁺ é um dos componentes-chaves na regulação da proliferação [15-17] através, principalmente, da ativação de fatores de transcrição no citoplasma ou no núcleo

celular [18, 19]. Esses fatores tornam a universalidade do sistema de sinalização de Ca^{2+} evidente e determinante em diversos processos do desenvolvimento.

A regulação de processos tão diversos pode ser explicada pela versatilidade dos sinais intracelulares de Ca^{2+} em termos de perfil, amplitude e padrões espaço-temporais que determinam sua especificidade [20]. As células geram sinais de Ca^{2+} através da utilização de fontes de Ca^{2+} tanto internas quanto externas. O armazenamento interno de Ca^{2+} é mantido dentro do sistema de membranas que compõe o retículo endoplasmático (ou do retículo sarcoplasmático em células musculares), no retículo nucleoplasmático e no envelope nuclear [20-23] e sua liberação é controlada em virtualmente todos os tipos de células, principalmente via receptores de rianodina (RyR) ou via receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato [24-26]. Os segundos mensageiros mobilizadores de Ca^{2+} , gerados através da ligação a receptores de membrana, determinam o canal a ser ativado [24] e diferentes tipos de sinais de Ca^{2+} são então originados.

Três isoformas de canais de RYR já foram descritas [27] e a ativação desses canais ocorre principalmente pelo próprio Ca^{2+} , resultando no fenômeno conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} [28, 29]. Já a sinalização via IP3R é iniciada geralmente pela ligação de hormônios ou fatores de crescimento a receptores transmembrana acoplados mais comumente à proteína G ou a tirosina cinase. A ativação destes receptores recruta diversos mensageiros celulares, incluindo a fosfolipase C que, uma vez ativada, induz a hidrólise de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, levando à produção de diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3). À partir daí, o IP3 difunde-se ao longo da célula e liga-se ao seu receptor específico, induzindo a liberação de Ca^{2+} [20, 30, 31]. Assim como no caso dos RyR, três isoformas de IP3R já foram descritas [32] e cada uma dessas isoformas difere na sua sequência de aminoácidos, sua afinidade por IP3 e pelo seu padrão de expressão nas células [33, 34].

A coordenação dos sinais de Ca^{2+} ocorre de maneira tão eficiente que esses podem ser regulados no núcleo, independente dos sinais de Ca^{2+} citoplasmáticos; por exemplo, a ativação de IP3R é capaz de induzir a liberação de Ca^{2+} em núcleos isolados de hepatócitos [35]. De fato, a presença de IP3Rs no núcleo é extensamente documentada tanto em células epiteliais como em células excitáveis [36, 37], assim como a de todos os componentes necessários para a sinalização de Ca^{2+} mediada por IP3 [22, 24].

Os sinais de Ca^{2+} nucleares e citoplasmáticos são regulados de forma independente e aumentos no cálcio nuclear produzem resultados biológicos específicos que diferem daqueles efeitos do aumento no cálcio citoplasmático [38]. Neste sentido, a sinalização de Ca^{2+} especificamente nuclear regula diretamente importantes funções celulares, incluindo a ativação PKC [22] e a transcrição de genes [18, 39].

No que diz respeito ao desenvolvimento tumoral, a desregulação dos sinais de Ca^{2+} intracelulares está intimamente ligada ao desenvolvimento de cânceres, tendo em vista o papel fundamental do Ca^{2+} na diferenciação, apoptose e proliferação celulares. De fato, a enzima 1-fosfadilinositol 4-quinase, responsável por catalisar a produção do precursor de IP3 encontra-se aumentada em diversas células tumorais [40]. Além disso, diversas drogas que impedem a entrada de Ca^{2+} nas células são capazes de retardar o crescimento em células de melanoma, carcinoma de pulmão e cólon [41] e em células de câncer de próstata [42]. Ainda, a subunidade $\alpha_2\delta$ de canais de Ca^{2+} voltagem-dependente é um potente supressor tumoral em diversos cânceres [43]. Entretanto, estudos anteriores demonstraram que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear, mas não do citoplasmático, regula a progressão no ciclo celular e a proliferação celular [17]. Ainda, importantes fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal humano, o fator de crescimento hepático e a insulina, induzem proliferação celular durante a regeneração hepática, através da formação seletiva de IP3 no núcleo [16, 44].

É extensamente sabido que a anormalidade fundamental para o desenvolvimento do câncer é a proliferação desregulada das células tumorais [45]. Nesse sentido, os efeitos do Ca^{2+} especificamente nuclear na regulação de ciclo celular e proliferação, fornecem fortes indicativos que o Ca^{2+} nuclear está envolvido não somente nas funções fisiológicas do organismo, mas também naquelas funções associadas ao desenvolvimento patológico. De fato, o Ca^{2+} nuclear aparece como importante regulador da proliferação também em células tumorais: a ativação do fator de transcrição Elk-1 em hepatocarcinomas é dependente do Ca^{2+} nuclear [39], assim como a regulação da proliferação celular *in vitro* e *in vivo*. Sinais nucleares de Ca^{2+} estimulam o crescimento celular e permitem que as células avancem através da fase inicial da prófase *in vitro* e impedem o desenvolvimento de tumores implantados subcutaneamente em camundongos [17]. Esses dados revelam o papel também patológico do Ca^{2+} nuclear e sugerem sua relevância como um potencial alvo para novas estratégias terapêuticas para regular condições de crescimento celular anormal. De fato,

estudos recentes mostram que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear sensibiliza as células de carcinoma humano de cabeça e pescoço à radiação, reduzindo a sobrevivência das células tumorais, mesmo com doses menores de radioterapia [46]. Entretanto, quais etapas do desenvolvimento tumoral são reguladas pelo Ca^{2+} nuclear ou os mecanismos dessa regulação ainda não são completamente entendidos. Isso deve-se, especialmente, à complexidade e diversidade de etapas da progressão tumoral.

Algumas alterações que determinam o desenvolvimento de um câncer são compartilhadas em praticamente todos os tipos de tumores; é o caso do aumento na taxa de proliferação celular, da formação angiogênica, da habilidade para invasão tecidual e metástase e do escape das células tumorais do sistema imune [45]. Por serem etapas comuns a diversos tumores, essas etapas tornam-se importantes alvos terapêuticos. Entre esses, a resistência à apoptose em conjunto com a proliferação descontrolada são considerados os principais fatores que possibilitam que um tumor se desenvolva em uma massa de tamanho considerável em um curto período de tempo [47, 48]. Por isso, diversos alvos que despertam sinais de morte em células tumorais ou que inibem a proliferação celular já foram propostos como novas formas de terapia antitumoral [49-51]. Entretanto, a proliferação excessiva apenas não é suficiente para produzir um tumor letal. A geração de uma massa letal necessita da proliferação celular e da angiogênese. De fato, a proliferação celular sozinha, na ausência da angiogênese, dá origem apenas a tumores limitados e de tamanho reduzido [52-55].

A angiogênese, o crescimento de novos capilares sanguíneos, é crucial para o desenvolvimento, reprodução e reparo celular e influencia diretamente diversas condições patológicas, incluindo psoríase, degeneração macular, artrite e endometriose [53] e o desenvolvimento de tumores [56]. Por regular a maioria das alterações que determinam o crescimento tumoral [57], a angiogênese foi considerada um atrativo alvo terapêutico e extensas pesquisas sobre possíveis inibidores de angiogênese foram realizadas desde então. Diversos reguladores da angiogênese foram identificados e isolados e hoje representam alvos terapêuticos importantes [58]. Progressos substanciais foram feitos nos últimos anos no que diz respeito à terapia antiangiogênica. Entretanto, para o câncer de mama triplo-negativo, as terapias antiangiogênicas consideradas mais promissoras continuam controversas e impactos significativos na sobrevida dos pacientes ainda não foram demonstrados [59, 60]. Portanto, a busca por novos alvos para tratamento desse tipo de

câncer permanece como extremamente relevante.

Além do desenvolvimento do tumor primário, o desenvolvimento de metástases em um sítio secundário é o responsável por aproximadamente 90% das mortes relacionadas ao câncer [61].

A migração celular é uma propriedade fundamental de muitas células que permitem que os organismos se desenvolvam, reparem danos teciduais e se defendam contra patógenos [62]. A sinalização intracelular de Ca^{2+} é uma das principais coordenadoras da migração celular [63, 64]. Por exemplo, a sinalização através de STIM/Orai, duas importantes proteínas de regulação dos sinais de Ca^{2+} , está envolvida na migração e progressão do ciclo celular em diversos cânceres, incluindo no câncer de mama [65, 66].

No que diz respeito à progressão tumoral, o processo metastático começa com a migração e invasão das células tumorais em direção a tecidos adjacentes e à corrente sanguínea e sistema linfático e então para órgãos secundários [67]. O processo metastático é composto por vários passos sequenciais e interligados que culminam na disseminação das células do tumor [68]. Os principais passos dessa cascata incluem a perda da adesão celular, o aumento da motilidade e da invasividade, a entrada e sobrevivência na circulação e a eventual colonização de um outro local [69, 70].

A migração celular é o resultado da coordenação espacial e temporal de atividades de protrusão, adesão e contração que culminam no movimento da célula para frente [67]. Uma das características do processo de motilidade celular *in vivo* é a formação de protrusões de membrana, ricas em F-actina, utilizadas pelas células para aderir a regiões adjacentes que, seguidas da contração da extremidade traseira da célula, movem a célula para frente [67].

Além dos processos migratórios, a invasão celular também é um processo determinante para o ciclo de motilidade celular. No que diz respeito ao processo de invasão, a proteína vinculina atua como um regulador chave na formação de junções aderentes e das adesões focais celulares [71]. De fato, a ativação de vinculina é um evento chave na formação das adesões focais, fator determinante para a supressão na motilidade celular.

A vinculina, expressa de forma ubíqua na célula, é uma proteína de ligação à actina que desempenha funções na formação de adesões focais [71] e na proliferação celular [72]. A perda de vinculina foi descrita como fundamental para o desenvolvimento de diversos cânceres, incluindo câncer de mama [73], indicando que a vinculina pode ter importantes efeitos antitumorais. Estudos recentes confirmaram esse achado, mostrando que a vinculina

inibe diversos processos associados com a malignidade tumoral, incluindo invasão, metástase e apoptose [72, 74]. De fato, células sem vinculina possuem menor adesão a diversas proteínas da membrana extracelular, maiores taxas de migração e menor número de adesão em comparação com células normais [74-77]. Ainda, baixos níveis de vinculina podem indicar baixos níveis de sobrevida em carcinoma de células escamosas [77] e em câncer coloretal [78].

A habilidade de tratar o câncer eficientemente está diretamente ligada não só à contenção do tumor primário mas também à capacidade de interferir no processo de formação metastática. O desenvolvimento de um tumor representa o produto de um processo biológico composto por diversos passos. Enquanto tratamentos cirúrgicos e terapias adjuvantes podem ser eficientes para conter o desenvolvimento do tumor primário, a formação de metástase ainda é altamente incurável [70, 79]. Nesse sentido, processos cruciais para o desenvolvimento tumoral, como a angiogênese, migração e invasão, mostram-se como alvos terapêuticos promissores para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a participação do Ca^{2+} nuclear no desenvolvimento de tumores de mama triplo-negativos.

Objetivos Específicos

- Avaliar a participação do cálcio nuclear na proliferação e progressão de tumores primários de mama.
- Investigar os mecanismos celulares e moleculares ligados à regulação do cálcio nuclear em tumores mamários.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura Celular

Células 4T1 (American Type Culture Collection), uma linhagem murina de câncer de mama triplo-negativo amplamente utilizada como modelo de câncer de mama humano (estágio IV) [80, 81], foram utilizadas nos experimentos e cultivadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF) (GIBCO) e 100 unidades/ml de penicilina e 100 unidades/ml estreptomicina (GIBCO). Células HEK-293 (Banco de Células do Rio de Janeiro) foram utilizadas para crescimento adenoviral e cultivadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em meio DMEM (GIBCO) e 10% SBF (GIBCO) e 100 unidades/ml de penicilina e 100 unidades/ml estreptomicina (GIBCO).

Animais

Camundongos Balb/C fêmeas (8 semanas) foram utilizados nos experimentos *in vivo*. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados seguindo as orientações estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG; protocolo 88/2013).

Construção Tamponadora de Ca²⁺ Nuclear

A construção adenoviral (adenovírus recombinante do tipo V), contendo o tamponador de Ca²⁺ nuclear, foi utilizada para reduzir os sinais de Ca²⁺ seletivamente no núcleo das células, conforme previamente descrito [44]. O domínio de ligação ao IP3 do receptor de IP3 humano do tipo I, resíduos 224-605, foi fusionado à proteína fluorescente vermelha monomérica (mRFP) e à sequência de localização nuclear (NLS) para gerar o vetor de expressão para tamponar o IP3 nuclear (IP3-sponge-NLS) [39, 82, 83]. A construção adenoviral IP3-sponge-NLS leva ao tamponamento do IP3 nuclear, prevenindo a ligação do IP3 nuclear aos seus receptores e, conseqüentemente, bloqueando o aumento do Ca²⁺ nuclear, como previamente descrito [46, 82, 84]. Uma construção adenoviral semelhante porém sem o sítio de ligação ao IP3 foi utilizada como controle. As construções adenovirais foram amplificadas em células HEK-293 e purificadas utilizando o método de Purificação e

Concentração Adenoviral (Fast-Trap®, Millipore). Para todos os experimentos com o tamponador, as células foram infectadas com 100 MOI, 48 horas previamente aos experimentos. A presença do tamponador nas células foi confirmada anteriormente a todos os experimentos através da expressão de fluorescência vermelha e mantida entre 80%-90%. Nos experimentos de transcriptoma foi utilizada a construção adenoviral vazia (Ad-RFP) no grupo controle. Apesar da construção adenoviral utilizada não ser por definição uma solução tampão em termos de características físicas e químicas, o termo “tamponador” será utilizado para efeitos de padronização de nomenclatura para evidenciar a capacidade da construção de regular os sinais de cálcio mantendo-os inalterados após estímulo, de maneira análoga ao que um tampão faria, a fim de manter o padrão de terminologia extensamente utilizado na literatura [17, 44, 46, 84, 85].

Amplificação, Purificação e Titulação Adenoviral

Para amplificação do tamponador de Ca^{2+} , células HEK-293 foram cultivadas em placas de cultura (150cm^2) até atingirem aproximadamente 80% de confluência. As células receberam o adenovírus em estoque comercial e após 48 horas, a purificação dos tamponadores foi realizada utilizando o método de Purificação e Concentração Adenoviral (Fast-Trap®; Millipore), de acordo com as especificações e recomendações do fabricante. Para titulação, 1×10^5 células foram plaqueadas em placa de 24 poços e depois de 24 horas, receberam diluições seriadas 10^{-1} a 10^{-11} de adenovírus, em triplicatas por diluição. A titulação dos adenovírus foi realizada pela visualização da formação de placas de lise em monocamada de células e o número de partículas virais em cada diluição foi determinado em unidades formadoras de placa.

Medidas de Ca^{2+} Nuclear

O transiente de Ca^{2+} foi monitorado como previamente descrito [22] nos dois grupos experimentais: grupo controle corresponde àquele grupo cujas células não receberam a construção adenoviral e grupo IP3-sponge-NLS que corresponde àquele grupo cujas células receberam o tamponador de cálcio nuclear. Células 4T1 (3×10^5 /poço) foram plaqueadas em lamínulas de 22x22mm e 24 horas depois, receberam ou não o tamponador adenoviral. Após 48 horas, as células foram marcadas com fluo4-aceto-metil-éster (fluo-4/AM) ($6\mu\text{M}$),

(INVITROGEN) e incubadas por 30 minutos a 37°C. As lamínulas foram então transferidas para uma câmara de perfusão adaptada para microscópio confocal Zeiss LSM 510 e perfundidas primeiramente com tampão HEPES para garantir a ausência de estimulação mecânica. Posteriormente as células foram estimuladas com fator de crescimento epidermal (EGF) (50ng/mL) [86] e as alterações de fluorescência do fluo-4/AM foram medidas utilizando objetiva de imersão em água, 63x, 1,2 AN, por 100 segundos. As células foram excitadas com laser 488nm e a emissão foi coletada em 515-530nm.

Desenho Experimental *in vivo*

Para indução tumoral, células 4T1 foram cultivadas e após 24 horas, receberam ou não o tamponador de Ca²⁺ nuclear. Após 48 horas, as células foram ressuspensas em PBS a densidade de 1,5×10⁶ e 100µL da suspensão injetados subcutâneamente na região cervical do animais para obtenção de tumores primários sólidos [87]. Os animais foram então divididos em dois grupos: o grupo controle recebeu a solução salina controle e o grupo IP3-sponge-NLS, o tamponador de Ca²⁺ nuclear. As inoculações do tamponador ou veículo, na região central do tumor, foram realizadas 5 e 10 dias após a indução tumoral. Os animais foram pesados diariamente durante o experimento e após 15 dias da inoculação das células tumorais, os animais foram eutanasiados e os tumores foram removidos.

Avaliação do Desenvolvimento Tumoral

Para avaliação do desenvolvimento tumoral, os tumores foram removidos cirurgicamente, pesados e medidos. As medidas do tumor foram determinadas com paquímetro e o volume do tumor calculado através da equação: volume tumoral (mm³) = $a \times b^2/2$, sendo a o maior diâmetro e b o menor diâmetro do tumor, ambos em mm [87]. O volume tumoral foi avaliado também por ressonância magnética (RM). Nesse caso, os animais foram anestesiados com uma mistura de halotano (4% para indução e 1,5% para manutenção), ar (0.8mL/L) e oxigênio (0.2mL/L) e a temperatura dentro do aparelho foi mantida a 37°C durante todo o processo, através de cobertor térmico. Imagens do local da implantação do tumor foram obtidas utilizando um scanner de 4.7 tesla, localizado no Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto Ressonância da Universidade Federal de Minas Gerais (CTPMAG). Foram obtidas imagens sequenciais *multi-slice spin echo* em secções coronais sequenciais de

1mm de espessura [88] e as aquisições foram realizadas nos dias 5, 10 e 15 após a implantação tumoral. Para análise das imagens e análise do volume tumoral foi utilizado programa MeVisLab.

Índice de Perfusão Tumoral

O monitoramento do influxo sanguíneo nos tumores foi realizado por imageamento não-invasivo Laser-Doppler (modelo MoorLDPI-2, Moor Instruments) nos dois grupos experimentais. Os animais foram anestesiados com solução de ketamina (150mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) e posicionados no aparelho para captação das imagens. Anestesia e temperatura foram mantidas constantes durante todo o protocolo experimental e entre todos os animais e as imagens coletadas 5, 10 e 15 dias após a indução tumoral. Para análise da perfusão tumoral, a região de interesse (ROI), determinada pelo contorno do tumor foi definida para cada animal. Para cada ROI, os valores do fluxo sanguíneo intratumoral foram obtidos por análise de densidade espectral, através do software moorLDI V5.0 [89]. Neste caso, as ondas refletidas pelo movimento das hemácias são captadas e processadas de acordo com mapa de cores.

Quantificação da Densidade Vascular Tumoral

Para detecção da densidade vascular tumoral, secções de 5µm dos dois grupos experimentais foram submetidas a coloração imunohistoquímica (IH). As secções foram submetidas à recuperação antigênica; as lâminas foram fervidas em tampão citrato de sódio (pH=6) por 25 minutos a 95°C e então resfriadas durante uma hora. Posteriormente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena; as secções foram incubadas por 5 minutos em peróxido de hidrogênio 3% e as ligações inespecíficas foram bloqueadas usando 5% albumina. As secções foram então coradas com anticorpo Anti-Von Willebrand Factor (FVW), (DAKO) e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com Link Universal Streptavidina-HRP (DAKO) biotilado. As reações foram reveladas através de 3,3'-diaminobenzidina em solução cromógena (DAKO) e as secções contra-coradas com hematoxilina, desidratadas em sucessivos banhos de álcool (70%, 80% e 100%), diafanizadas e montadas em Permount (Fisher Scientific). Controles negativos foram realizados através da omissão do anticorpo primário, resultando na ausência de coloração detectável. Para análise

morfométrica do número de vasos, 5 imagens aleatórias foram capturadas em objetiva de 20× em microscópio. As imagens foram analisadas no software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics) e os resultados calculados pela relação entre o número de vasos sanguíneos e área total tumoral.

Análise da Área de Morte Celular

Tumores de animais dos dois grupos foram retirados após eutanásia, fixados em solução 10% formol neutro tamponado e embebidos em parafina. Secções de 5µm foram utilizadas para análises histológicas de morte celular tumoral, após coloração das secções por hematoxilina e eosina. Para análise da área de morte celular, imagens digitais de 5 secções de cada lâmina foram randomicamente selecionadas e analisadas e a área de morte celular determinada pela avaliação histológica das secções. As áreas das regiões de morte celular foi determinada através de análise no programa ImageJ e foi definida pela razão entre a área de morte celular e a área total dos tumores.

Avaliação de Proliferação Celular

Para detecção de células em atividade proliferativa foi realizada IH para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Secções de 5µm dos dois grupos foram submetidas à recuperação antigênica; as lâminas foram fervidas em tampão citrato de sódio (pH=6) por 60 minutos a 95°C e então resfriadas durante uma hora. Posteriormente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena; as secções foram incubadas por 5 minutos em peróxido de hidrogênio 3% e as ligações inespecíficas foram bloqueadas com 5% albumina. As secções foram então coradas overnight com anticorpo para PCNA (1:50, DAKO) e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com Link Universal Streptavidina-HRP biotinilado (DAKO). As reações foram reveladas através de DAB (DAKO) e as secções contra-coradas com hematoxilina, desidratadas em sucessivos banhos de álcool (70%, 80% e 100%), diafanizadas e montadas em Permount (Fisher Scientific). Controles negativos foram realizados através da omissão do anticorpo primário, resultando na ausência de coloração detectável. Para realização da análise morfométrica do número de núcleos positivos para PCNA, 24 imagens dos cortes histológicos foram obtidas através de uma micro câmera (Olympus Q-color 5) acoplada ao microscópio de luz (Olympus BX43), (4 animais, 6 campos/tumor), capturadas

com uma objetiva de 20x em microscopia de luz (magnificação final = 200x). Cada pixel da imagem foi usado para criar uma imagem binária para quantificação automática dos núcleos positivos para PCNA.

Curva de Proliferação

Para avaliação da proliferação celular, células 4T1 (1×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços em triplicata e, após adesão, mantidas por 18 horas em meio sem SBF para sincronização do ciclo celular. As células receberam ou não o tamponador de Ca^{2+} nuclear e, após 48 horas, tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer, com azul de Tripán, para exclusão das células não viáveis após 24, 36, 48 e 72 horas da infecção com a construção adenoviral.

Medidas de Incorporação de BrdU

A proliferação celular também foi avaliada por incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) através de ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (Roche Applied Science). Células 4T1 (3×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e, 24 horas após o plaqueamento, mantidas em meio sem SBF por 18 horas para sincronização do ciclo celular. Após o carenciamento, as células receberam ou não o tamponador de Ca^{2+} nuclear e meio com 10% SBF foi adicionado normalmente às células. Controle experimental da parada de proliferação celular foi realizado mantendo as células em meio sem SBF (0%) durante todo o processo. Após 48 horas da infecção, as células foram marcadas com 10 μL /poço de BrdU (Kit III, Roche) e incubadas por 2 horas a 37°C. As células foram então fixadas por 30 minutos e incubadas com 100 μL de nuclease por poço, por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 100 μL de anti-BrdU por poço e incubadas por 30 minutos. Finalmente, foram adicionados 100 μL /poço de substrato de peroxidase. Após a incorporação do substrato colorimétrico foi realizada leitura espectrofotométrica.

Ensaio de *Wound Healing*

Células 4T1 (1×10^5 células/poço) foram plaqueadas em triplicata em placa de 24 poços e após 24 horas receberam ou não o tamponador de Ca^{2+} nuclear. Após atingirem confluência,

fendas foram criadas utilizando uma pipeta (200µL), fazendo uma ranhura em linha reta ao longo do poço, a fim de mimetizar uma lesão [90]. Debris celulares foram retirados após 3 lavagens com PBS e imagens em contraste de fase foram coletadas no momento da realização da fenda (0 horas) e após 6, 24 e 48 horas da realização da fenda. Para eliminar o efeito da proliferação no fechamento da lesão, Hidroxiuréia (1µM), um inibidor de ribonucleotídeo redutase [91], foi adicionado ao meio de cultura durante todo o processo de exposição ao tamponador de Ca²⁺ nuclear para garantir que os efeitos observados no experimentos sejam consequência da migração celular e não de alterações no processo de proliferação celular. O fechamento da fenda foi estimado como porcentagem da área da fenda em relação à área inicial (0 horas).

Tracking Celular

Células 4T1 (1x10⁵ células/poço) foram plaqueadas em placa de 24 poços e após 24 horas, receberam ou não o tamponador de Ca²⁺ nuclear. Para realização do *tracking* de células, o fechamento da fenda foi monitorado através do aparelho Biostation IMq time-lapse Imaging System (Nikon): as células foram mantidas à 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ no aparelho Biostation e filmadas durante 8 horas. O *tracking* celular foi desenvolvido através do software Volocity® - Tracking in Volocity Software (Perkin Elmer). Primeiramente, para caracterização do movimentos das células, 20 células localizadas na borda da fenda foram aleatoriamente selecionadas. Para cada uma destas células, os núcleos celulares foram identificados em todos os *timepoints* ao longo do tempo total avaliado e posteriormente conectados através de algoritmo de *tracking* (Volocity®), indicando a posição da células em intervalos de 20 minutos. Para cada célula selecionada foram avaliados a velocidade média, distância percorrida e a direcionalidade do movimento, determinada pela razão entre deslocamento e distância total percorrida [92].

Ensaio de Invasão em Matrigel

Para análise da capacidade invasiva tumoral foi utilizado o QCM24-well Collagen-based Invasion Assay (Chemicon International), de acordo com as instruções do fabricante. Células 4T1 (1x10⁶ células/poço) foram plaqueadas em triplicata em meio sem SBF em inserto contendo poros de 8µm em membrana previamente tratada com camada de Matrigel. Meio

contendo 20% de SBF foi adicionado à câmara inferior das placas como quimioatrativo para a invasão celular e placa foi então incubada por 48 horas a 37°C para permitir a invasão das células da câmara superior para inferior. Após 24 horas, as células no poço inferior foram dissociadas, lisadas e marcadas com solução de coloração (CyQuant GRdye, Molecular Probes). A quantificação das células invasivas foi realizada através de coloração fluorimétrica.

Análise da Morfologia Celular

Células 4T1 ($0,5 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas em placas de cultura Hi-Q4 e após 24 horas, receberam ou não o tamponador de Ca^{2+} nuclear por 48 horas. O fechamento da fenda ao longo do tempo foi monitorado através do aparelho Biostation IMq time-lapse Imaging System (Nikon®). Uma célula representativa, localizada no limite da fenda, foi selecionada para cada grupo e a morfologia destas células foi monitorada ao longo do tempo, em cada frame, em intervalos de 20 minutos durante 4 horas. Para definição da morfologia celular, o contorno da membrana celular por definido manualmente no programa ImageJ em cada um dos tempos e seu perfil morfológico analisado.

Imunofluorescência para Adesão Focal

Para avaliação da adesão focal foi realizada imunofluorescência (IMF) utilizado o *Actin Cytoskeleton/Focal Adhesion Staining Kit* (Merck/Millipore). Células 4T1 (3×10^5 células/poço) foram plaqueadas em lamínulas de 22mmX22mm e após 24 horas, receberam ou não o tamponador de Ca^{2+} nuclear. Após 48 horas uma fenda foi criada nas lamínulas e após 24 horas da instauração da fenda, as células foram fixadas com paraformolaldeído 4% por 15 minutos e permeabilizadas por 15 minutos com 0,1% Triton® X-100 à temperatura ambiente. Sítios de ligação não específicos foram bloqueados com solução de PBS contendo 10% (v/v) de soro de cabra e 1% (p/v) BSA, por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida as células foram marcadas com anticorpo primário anti-vinculina em concentração 1:200 por uma hora e então marcadas com anticorpo secundário goat anti-mouse, Alexa 488 (Molecular Probes), 1:500 por uma hora à temperatura ambiente. Para marcação do núcleo, as células foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente com DAPI, 1:1000. Todas as etapas foram seguidas de 3 lavagens com PBS e os anticorpos foram diluídos em

PBS e 1% BSA. As lâminas foram montadas utilizando *Hydromount* (National Diagnostics, EUA) [22, 93]. Para controles negativos, células foram incubadas apenas com anticorpo secundário. Imagens confocais imunofluorescentes foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510. Para quantificação da vinculina (ou adesão focal), foram consideradas como adesões focais as marcações que preencheram os seguintes critérios: área (1-10 μm^2) e localização (periferia celular ou perinuclear) [94]. Imagens confocais foram utilizadas para quantificação do número de adesões focais e foram obtidas usando microscópio confocal Zeiss LSM 510 usando objetiva de 63 \times . Para detectar Alexa 488 foi utilizada excitação a 488nm e emissão a 560-610nm, para detecção da proteína mRFP, foi utilizada excitação de 543nm e emissão a 560-610nm e para DAPI foi utilizada excitação a 258nm e emissão a 461nm. A quantificação foi realizada utilizando o programa ImageJ e realizada pela seleção de estruturas com um a variação de pixels abaixo do valor de *threshold* determinado [95]. As análises foram feitas em 5 campos de cada grupo e 20 células por campo foram avaliadas.

Sequenciamento de RNA

Análise de sequenciamento completo de RNA (RNAseq) foi utilizado para monitorar a mudança na expressão gênica após o tamponamento do Ca²⁺ nuclear. Células 4T1 (2 $\times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas em placa de 6 poços, tratadas com as construções Ad-RFP ou IP3-sponge-NLS e após 48 horas, o RNA total foi extraído através do RNeasy Mini Kit (Qiagen®), segundo recomendações do fabricante. À partir de aproximadamente 3 μg de RNA total, o mRNA foi isolado, fragmentado e convertido em cDNA de acordo com o protocolo Illumina RNAseq (Illumina, Inc.). *Reads* foram obtidos utilizando o Illumina HiSeq2500 no *Yale Center for Genomic Analysis* (Yale). Os resultados em *reads* foram mapeados com relação à sequência genoma GRCm38.75, obtidos no banco de sequências do Ensembl, utilizando o programa Bowtie2 e seus parâmetros padrões e quantificados utilizando o programa HTseq-count. Análises estatísticas foram realizadas através do programa R, utilizando o pacote DESeq2.

Construção de Via de Angiogênese

Para determinar a associação entre os genes encontrados como *upregulated* e *downregulated* e angiogênese, foi utilizada abordagem de mineração de texto.

Primeiramente, artigos com um grande número de genes ligados à angiogênese mencionados em seus resumo foram utilizados na ferramenta de mineração de texto *Medline Ranker* (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~jfontain/cms/>) e comparados com os resultados obtidos pela busca das palavras “*Angiogenesis*” no Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Os artigos foram então ranqueados de acordo com a ocorrência dos termos nos dois conjuntos de resumos [96] e artigos ranqueados nas 1000 primeiras posições ($p < 0,01$) foram utilizados no programa PESCADOR para definir a ocorrência de interações entre os genes encontrados [97, 98]. Os genes encontrados foram comparados aos genes classificados como *upregulated* e *downregulated* e as formas de interação destes genes serviram como referência para a construção de uma via de angiogênese utilizando a ferramenta PathVisio para análise e edição de vias biológicas (<http://www.pathvisio.org>) [99].

Ensaio de Imunoblot

Para extração de lisados totais de proteínas, células 4T1 (3×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços, tratadas ou não com a construção adenoviral e após 48 horas, foi realizada a extração de proteínas das amostras. Para isto, as proteínas foram solubilizadas em 50µL de tampão de lise, 1µL de inibidor de protease/poço (SIGMA) e sua dosagem realizada pelo método de Bradford [100]. 15µg de proteína foram diluídos em tampão de amostra para separação em gel SDS-PAGE (sódio dodecil laurel sulfato-eletroforese em gel de poliacrilamida) em concentração de 12% (BIORAD). Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas (TRANS-BLOT® TURBO™ TRANSFER SYSTEM) para membrana de nitrocelulose (BIORAD) e coradas posteriormente com Ponceau (Amersham Biosciences) para verificar a qualidade da transferência. As membranas foram bloqueadas em tampão contendo Tris 50mM, NaCl 150mM e 0,05% Tween20 (TBST) e 5% albumina overnight a 4°C. Após bloqueio as membranas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos em TBST e incubadas por 2 horas com o anticorpo primário anti-vinculina (Millipore®), 1:5000 à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas com TBST 3 vezes durante 5 minutos e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário IgG conjugado com peroxidase, anti-mouse na diluição 1:10000 e revelados através do ImageQuant LAS 4000 (GE® Healthcare Life Sciences). Para análise quantitativa,

controles positivos foram realizados; para isto, a membrana foi incubada com anticorpo primário anti- β actina, 1:5000 por duas horas à temperatura ambiente e posteriormente incubada com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com peroxidase, 1:5000. A quantificação foi realizada utilizando o programa de análise ImageJ e a expressão de vinculina quantificada pela média das razões entre a intensidade da banda de vinculina pela intensidade da banda de β -actina.

Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

RNA total de células foi isolado utilizando reagente Trizol (Tri Reagent[®]) (SIGMA) de acordo com as instruções do fabricante. Células 4T1 (2×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços, receberam ou não o tamponador de Ca^{2+} nuclear e 48 horas depois, 1 ml de Trizol foi adicionado a cada poço. A cada tubo do homogenato foi adicionado 200 μ l de clorofórmio (Merck Millipore), homogeneizados por 15 segundos e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 12000g a 4°C. Após centrifugação, a fase superior aquosa foi coletada e foram adicionados 500 μ l de isopropanol (Merck Millipore); as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 12000g a 4°C. O RNA precipitado foi lavado duas vezes com 1mL de álcool 75% (Merck Millipore), solubilizados em água livre de nucleases (20 μ l/tubo) e aquecidos a 60°C por 10 minutos. A concentração final do RNA foi dosada em espectrofotômetro NanoDrop[™] (Thermo Scientific) a 260/280nm e as concentrações determinadas em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. 1 μg de cada amostra foi submetido à ação da RNase-free DNase (Promega) e realizada transcrição reversa em cDNA, utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi utilizado em ensaio de PCR para análise quantitativa dos mRNA, utilizando o QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) de acordo com as informações do fabricante. As sequências dos primers utilizados foram β -actina: 5' GTGACGTTGACATCCGTAAG 3' (forward) e 5' GCCGGACTCATCGTACTCC 3' (reverse); CXCL10: 5' CTCGCAAGGACGGTCCGCTG 3' (forward) e 5' CGTGGCAATGATCTCAACACGTGG 3' (reverse). Relative mRNA expression was determined by the comparative Ct method using Bio-Rad software (Bio-Rad).

Ensaio de ELISA para Dosagem de CXCL10

Dosagem de CXCL10 secretado foi realizada através de ensaio imunoenzimático ELISA (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante. Células 4T1 (1×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas ou não com o tamponador de cálcio nuclear por 48 horas. Para cálculo da concentração, uma curva padrão, realizada pela utilização de diluições seriadas de amostra padrão foi realizada para cada experimento. 100µl do sobrenadante de cada amostra, padrões e controles foram adicionados aos poços pré-tratados com anticorpos monoclonais específicos para CXCL10 e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Amostras foram realizadas em duplicata. Após lavagens sucessivas, solução de CXCL10 conjugado com biotina foi adicionada aos poços e incubados por 45 minutos a temperatura ambiente. Após lavagens, enzima streptavidina-peroxidase foi adicionada aos poços e incubada por 45 minutos a temperatura ambiente. Um substrato cromógeno é então adicionado aos poços e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após 20 minutos, a reação foi interrompida através da adição de solução de parada. Leitura da absorbância de cada amostra foi realizada com filtro de 450nm. Quantificação de CXCL10 foi calculada através da curva obtida pela absorbância dos padrões x concentrações dos padrões e determinada em pg/mL.

Análise Estatística

Todos os dados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes e estão expressos pela média \pm SD. A análise estatística foi realizada no programa Prism (GraphPad 5.0, San Diego, Ca). Comparações entre os grupos experimentais foram realizadas através de test t de Student (Student's t test). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Dados do HiSeq foram analisados no programa R, utilizando o pacote DESeq2.

RESULTADOS

RESULTADOS

O tamponamento de IP3R reduz de forma eficiente os sinais de Ca²⁺ no núcleo das células

Sinais de Ca²⁺ ocorrem independentemente nos compartimentos nucleares e citosólicos e um dos mecanismos associado à liberação de Ca²⁺ nuclear ocorre pela ativação de IP3Rs [101]. Para avaliar a participação do Ca²⁺ nuclear no desenvolvimento de tumores de mama, células 4T1 receberam a construção tamponadora de IP3R e os sinais de Ca²⁺ nucleares foram avaliados através de microscopia confocal de células marcadas com fluo-4/A. Nossos resultados mostram que o tamponamento de IP3 nuclear reduz de forma significativa os sinais de Ca²⁺ no núcleo das células de câncer de mama triplo-negativo (Figura 1A), após perfusão com EGF (Controle = 169,5 ± 35,74 %; IP3-sponge-NLS = 6,889 ± 1,904).

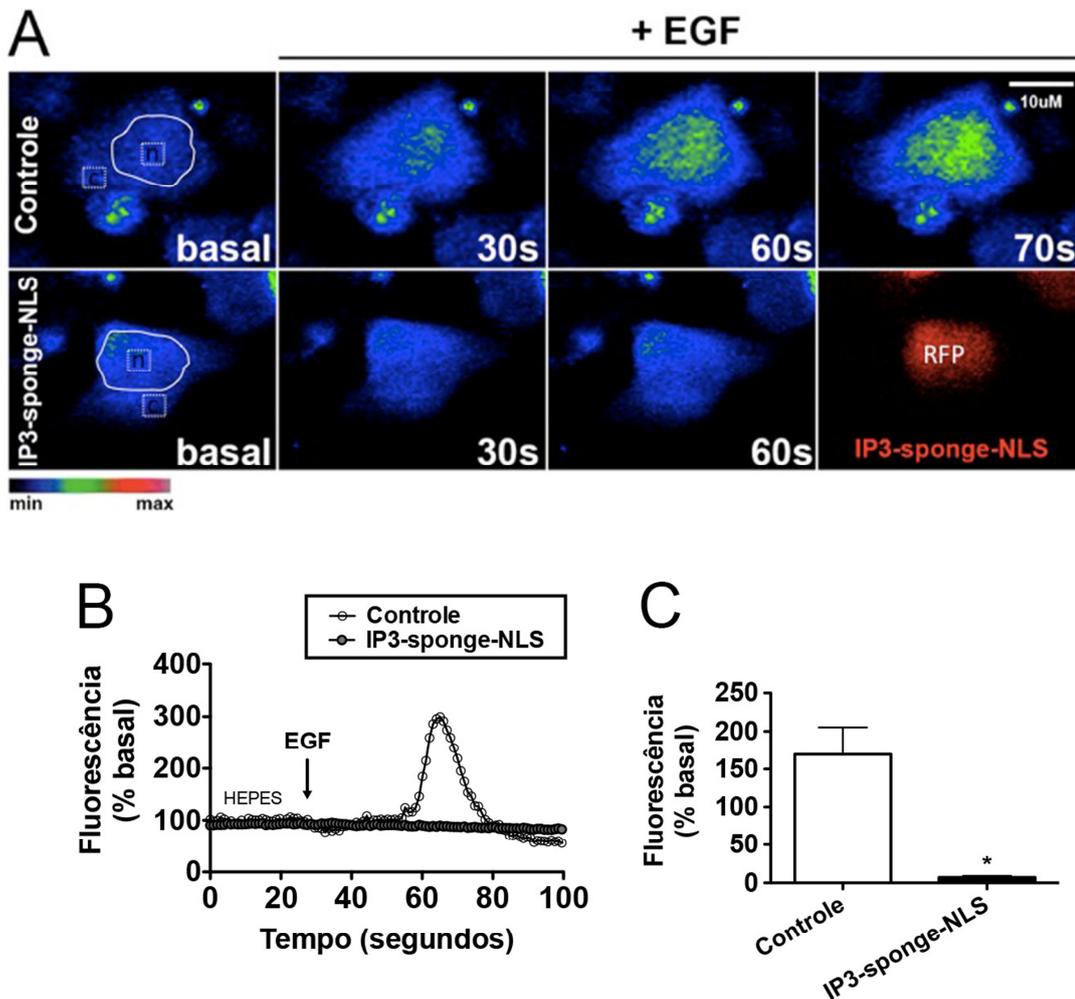


Figura 1. O tamponamento de IP3R reduz os sinais de Ca^{2+} no núcleo das células tumorais. (A) Imagens seriais de microscopia confocal de células representativas marcada com fluo-4/AM e estimuladas com EGF (50ng/mL) (+EGF) após 30, 60 e 70 segundos. Imagens mostram sinais de Ca^{2+} na região nuclear de interesse (n). Imagens coloridas artificialmente de acordo com o mapa de cores indicado na parte inferior do painel. Painel inferior direito indicativo da fluorescência do tamponador IP3-sponge-NLS. Barra de escala = 10 μ M. (B) Fluorescência no núcleo de uma células representativa ao longo do tempo de estimulação. A seta indica a adição de EGF à perfusão celular. Fluorescência expressa como % de aumento da fluorescência basal. (C) Média de fluorescência na região nuclear das células. Fluorescência expressa como % de aumento da fluorescência basal. n=20. * = p<0.05. Valores expressos em média \pm SD.

O tamponamento do Ca²⁺ nuclear impede o crescimento tumoral *in vivo*

Experimentos *in vivo* foram conduzidos para avaliação dos efeitos do tamponamento do Ca²⁺ nuclear no desenvolvimento de tumores de mama triplo-negativos. Tumores primários foram induzidos e após estabelecimento, submetidos a regimes de tratamento com a construção tamponadora, conforme desenho experimental (Figura 2A). Após pesagem diária dos camundongos, não foi encontrada diferença significativa no peso dos animais (Figura 2B). Entretanto, o tamponamento do Ca²⁺ nuclear causa redução significativa do peso tumoral (Controle = 0,0620 ± 0,025 g; IP3-sponge-NLS = 0,017 ± 0,007 g); (Figuras 2C,D) em relação ao grupo controle. Além disso, houve redução também do volume tumoral avaliado por ressonância magnética (Controle = 837,1 ± 136,3 a.u.; IP3-sponge-NLS = 519,2 ± 25,14 a.u.); (Figuras 3A, B), dado corroborado pela avaliação do volume tumoral através das medidas de tamanho do tumor (Controle = 88,86 ± 37,56 mm³; IP3-sponge-NLS = 24,50 ± 10,19 mm³); (Figura 3C).

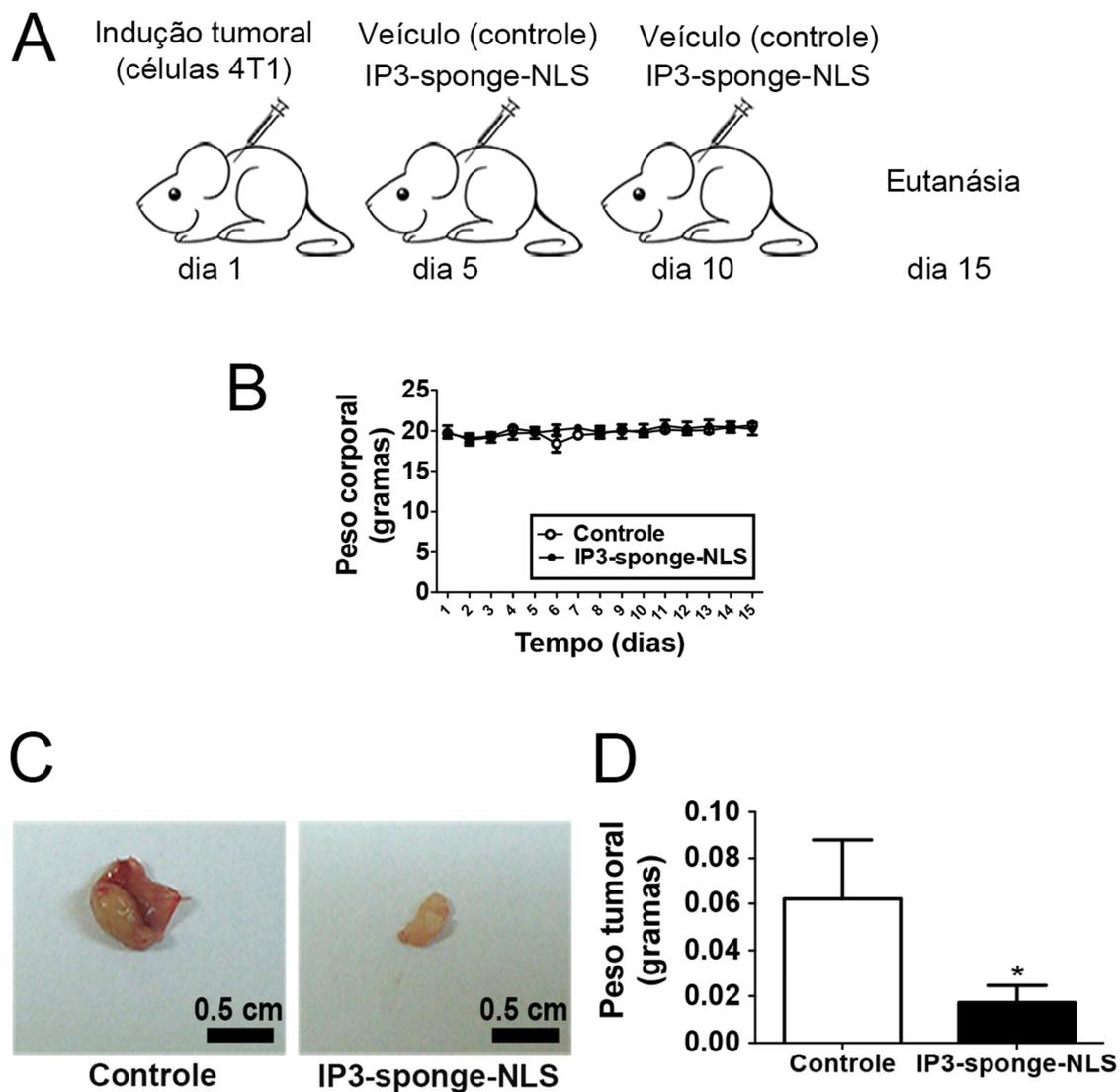


Figura 2. O tamponamento do Ca^{2+} nuclear impede o crescimento tumoral *in vivo*. (A) Desenho experimental *in vivo*. (B) Peso corporal dos camundongos ao longo do tempo. (C) Imagem de tumores representativos após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear. Barra de escala = 0,5cm. (D) Média do peso dos tumores, 15 dias após a indução tumoral. (E) Relação entre peso corporal e peso tumoral, 15 dias após a indução tumoral. * = $p < 0,05$. Valores expressos em média \pm SD. $n = 5-6$ animais/grupo.

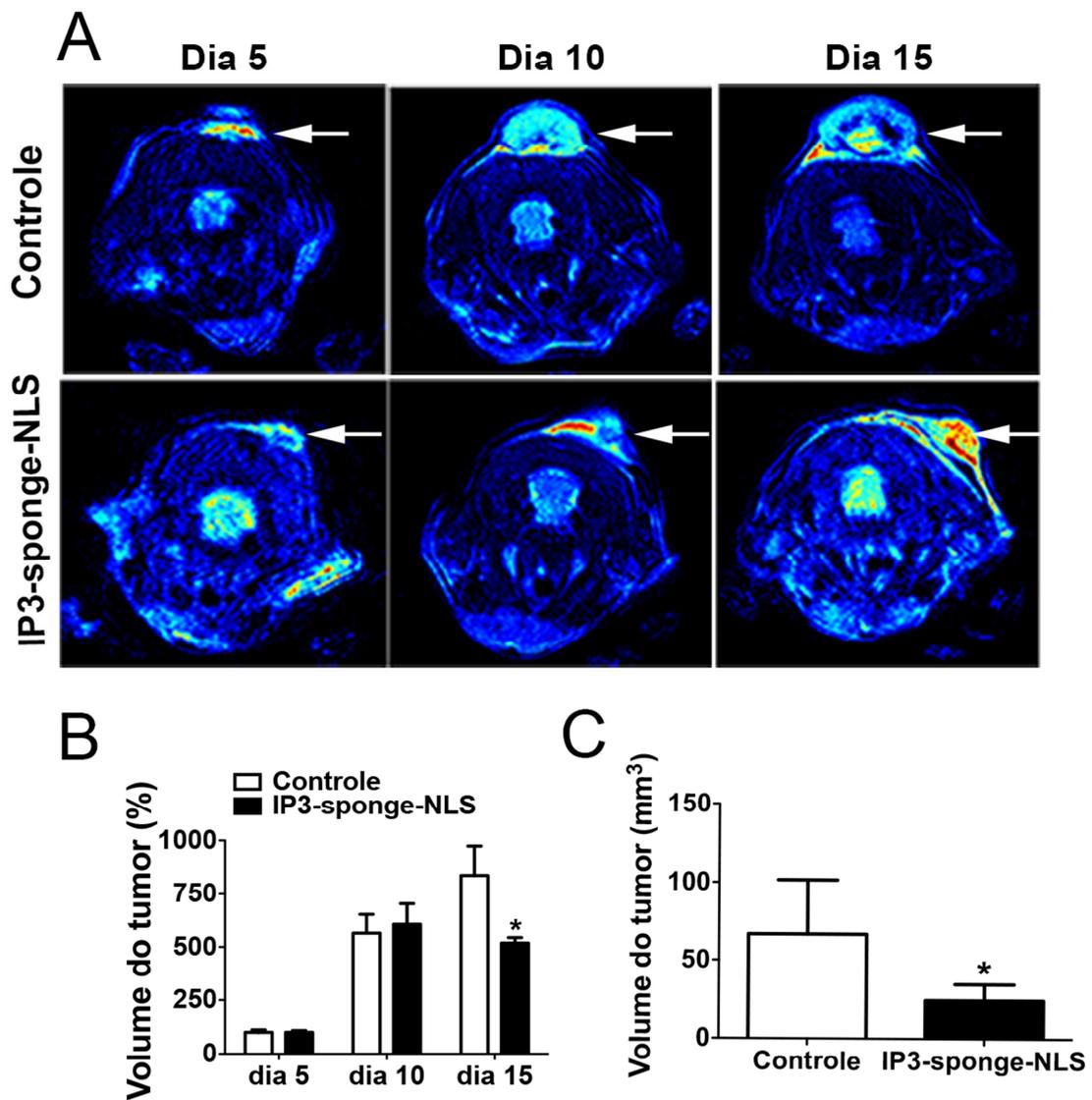


Figura 3. O tamponamento do Ca^{2+} nuclear restringe o crescimento tumoral *in vivo*. (A) Imagens representativas de ressonância magnética dos tumores 5, 10 e 15 dias após a indução tumoral. Setas brancas indicam a localização do tumor. (B) Volume tumoral (%) calculado por RM nos dias 5, 10 e 15 da indução tumoral. (C) Análise volumétrica do tumor através do cálculo da expressão: volume tumoral (mm^3) = $a \times b^2/2$. * = $p < 0,05$. Valores expressos em média \pm SD. $n = 6$ animais por grupo.

A redução do Ca²⁺ nuclear induz o aumento da morte das células tumorais *in vivo*

A evasão da morte celular é considerado um dos principais processos que conduzem às transformações malignas e a manutenção tumoral. Por isso, as principais terapias antitumorais utilizadas atualmente têm como principal efeito a morte das células tumorais. Por isso, a área de morte celular tumoral após o tamponamento do Ca²⁺ nuclear foi avaliada. O tamponamento do Ca²⁺ nuclear aumenta a área de morte celular tumoral em relação à área total dos tumores (Controle = 27,33 ± 4,638%; IP3-sponge-NLS = 72,18 ± 14,96%) (Figuras 4A, B, C). Esse resultado indica que o tamponamento do Ca²⁺ nuclear favorece a morte das células principalmente na região central do tumor, local da administração direta da construção tamponadora de Ca²⁺.

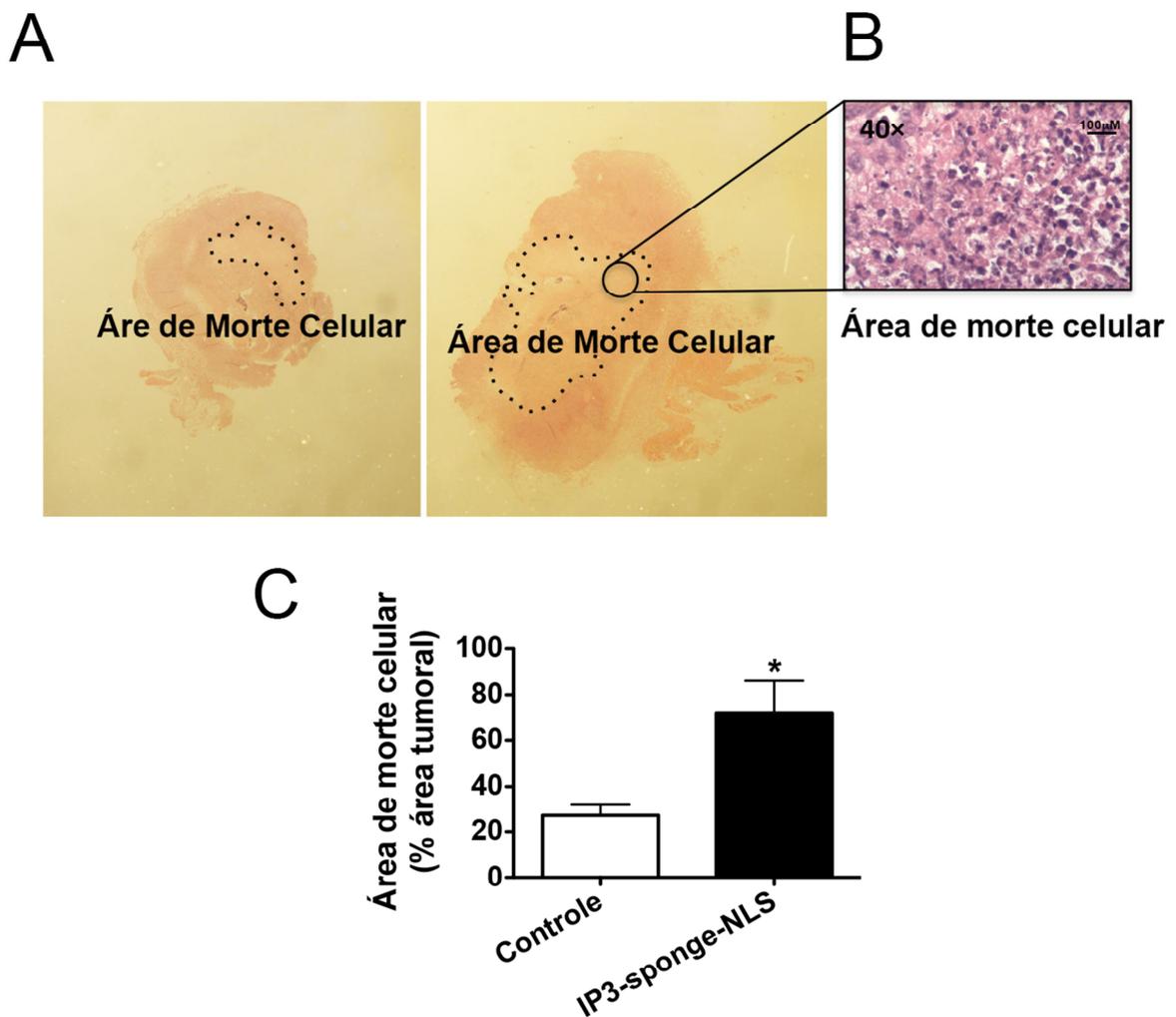


Figura 4. Redução do Ca^{2+} nuclear causa o aumento da morte das células tumorais *in vivo*. (A) Imagem representativa de microscopia estereoscópica indicando área de morte celular tumoral, representada pela linha preta pontilhada. (B) No detalhe, imagem representativa da área de morte celular. Barra de escala = 100µM. (C) Representação da média da área de morte celular tumoral. Área de morte celular representada como % da área total tumoral. * = p<0,05. Valores expressos em média \pm SD. n = 6 animais por grupo; 5 campos de visão por animal.

O tamponamento do Ca²⁺ nuclear reduz a proliferação das células tumorais *in vitro*

A proliferação celular é uma peça chave no desenvolvimento tumoral, amplamente regulada pelo Ca²⁺ nuclear [15]. Para avaliar esse aspecto do desenvolvimento tumoral, a taxa de proliferação das células de câncer de mama foi avaliada após a redução do Ca²⁺ nuclear. A avaliação da proliferação celular mostrou redução significativa no número de células após o tamponamento do Ca²⁺ nuclear (Controle = 310000 ± 15280 células; IP3-sponge-NLS = 183300 ± 16670 células); (Figura 5A) *in vitro*. Esse resultado foi confirmado pela redução da incorporação de BrdU após a redução do Ca²⁺ nuclear nas células (Controle = 0,9112 ± 0,02998 u.a; IP3-sponge-NLS = 0,6732 ± 0,05767 u.a.); (Figura 5B) também *in vitro*. Além disso, a proliferação celular foi avaliada através da marcação imunohistoquímica para PCNA em cortes de tumores de mama e evidencia a redução da proliferação celular tumoral também *in vivo* após o tamponamento do Ca²⁺ nuclear (Controle = 2796 ± 337,8/μm²; IP3-sponge-NLS = 1583 ± 112,2/μm²); (Figuras 5C, D).

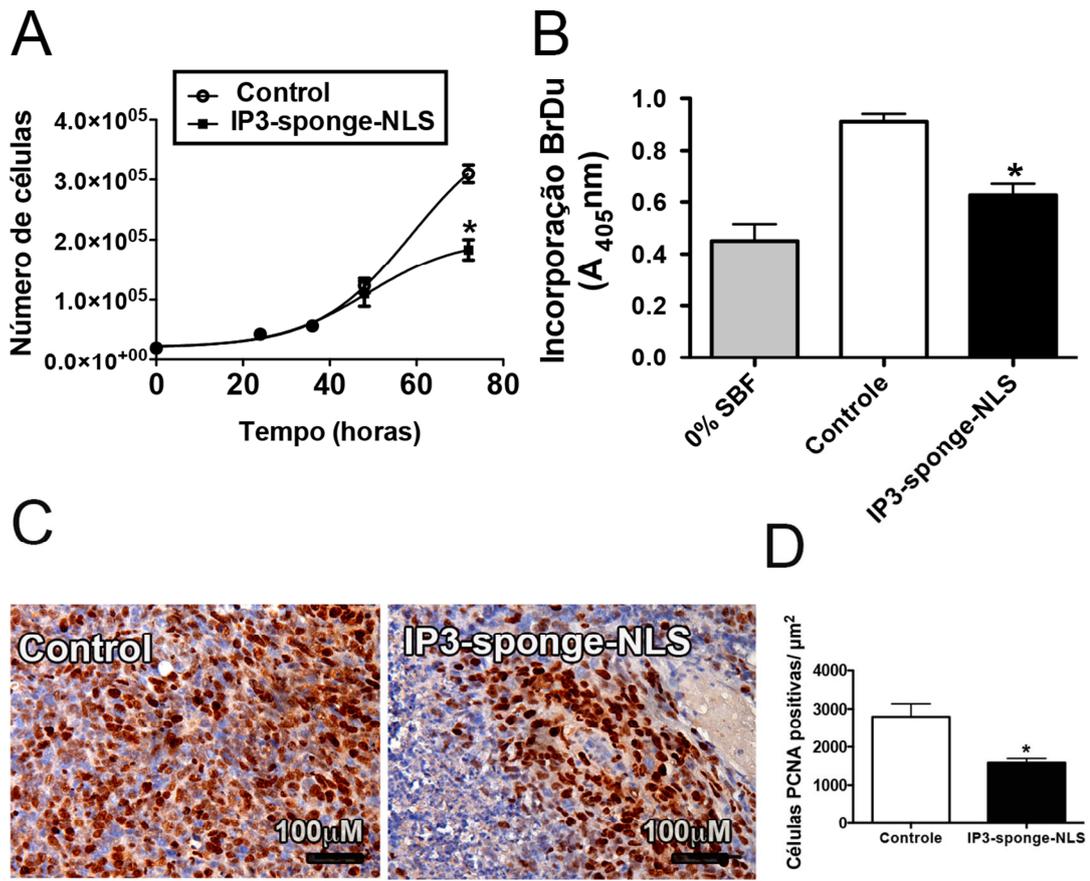


Figura 5. O tamponamento do Ca²⁺ nuclear causa redução da proliferação das células tumorais *in vitro* e *in vivo*. (A) Curva de proliferação celular, indicando o número de células após 24, 36, 48 e 72 horas do recebimento do tamponador de Ca²⁺. Resultados expressam a média de 3 experimentos independentes. (B) Média da taxa de incorporação de BrdU, 72 horas após o tamponamento do Ca²⁺ nuclear. No gráfico, controle negativo experimental (0% SBF) indicado pela barra cinza no gráfico. (C) Imagens representativas de imunohistoquímica para PCNA. Barra de escala = 100µm. (D) Quantificação a média do número de células positivas para PCNA/µm². * = p<0,05. Valores expressos em média ± SD.

Redução do Ca^{2+} nuclear nas células tumorais leva à redução do índice de perfusão sanguínea tumoral

Tumores induzem o surgimento de novos vasos, à partir da vasculatura existente, e esse processo é vital para o crescimento tumoral [56]. De fato, os novos vasos formados levam nutrientes e oxigênio até a massa tumoral, permitindo seu crescimento. Portanto, o aumento da área de morte celular e redução da proliferação tumoral podem ser efeitos da redução dos vasos sanguíneos. Para verificar a angiogênese tumoral, o influxo sanguíneo nos tumores foi quantificado utilizando laser-Doppler, após 5, 10 e 15 dias da indução tumoral e verificou-se que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear resulta na limitação da perfusão sanguínea nos tumores. De fato, 10 dias após a indução dos tumores, o influxo de sangue é menor nos tumores submetidos ao tamponamento do Ca^{2+} nuclear (Controle = $1,375 \pm 0,1912$ a.u.; IP3-sponge-NLS = $0,6050 \pm 0,07643$ a.u.); (Figuras 6A, B). Além disso, o número de vasos, quantificado após marcação imunohistoquímica de FWV, indica redução também na quantidade de vasos após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear (Controle = $256,8 \pm 22,05$ vasos; IP3-sponge-NLS = $140,0 \pm 7,066$ vasos); (Figuras 7A, B). Estes dados confirmam a participação do Ca^{2+} nuclear como limitante da angiogênese tumoral, afetando não somente o número de vasos no tumor, mas também o influxo sanguíneo.

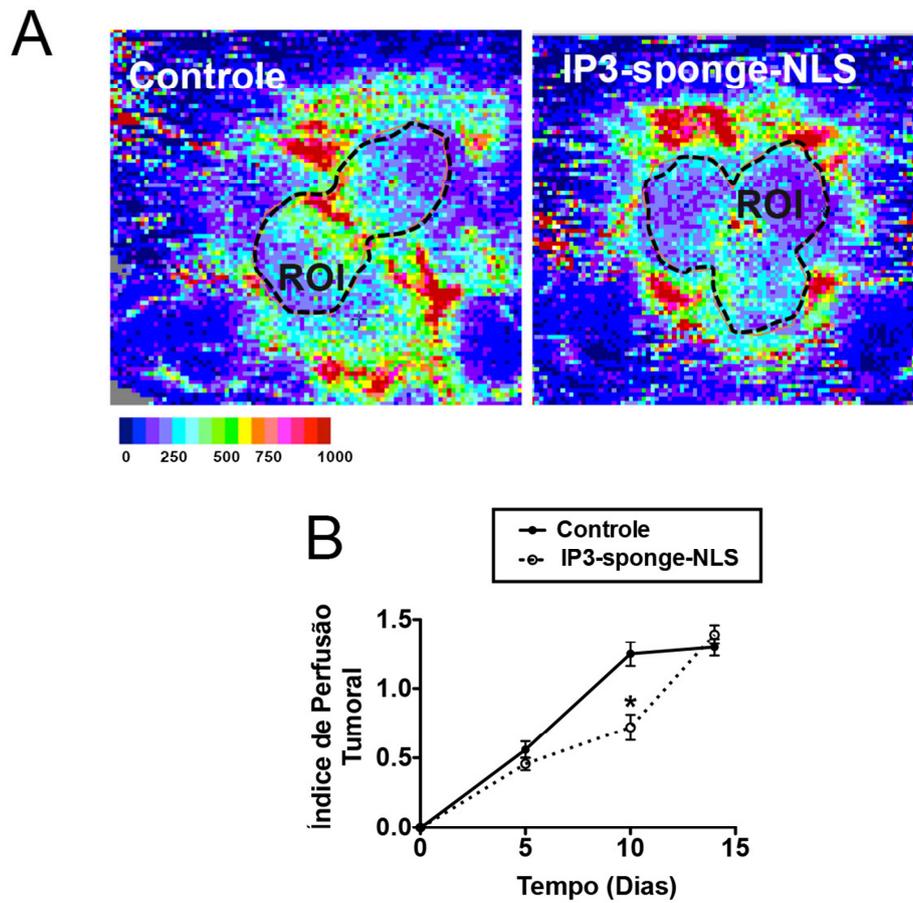
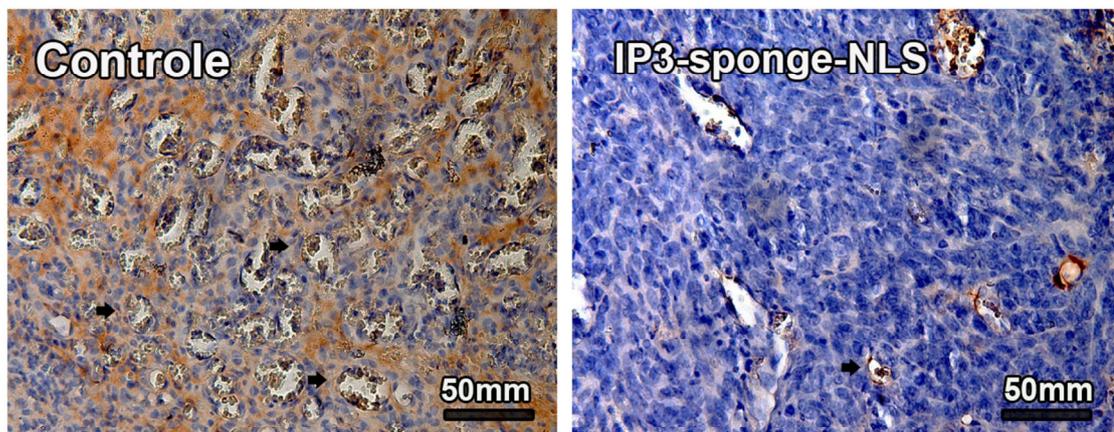


Figura 6. Redução do índice de perfusão sanguíneo tumoral após redução do Ca^{2+} nuclear. (A) Imagens representativas de Laser-Doppler não-invasivo. Região tumoral utilizada para as análises demarcada na imagem por linhas pretas pontilhadas (ROI). Nível de perfusão tumoral analisado de acordo com a escala de cores representada na imagem. (B) Quantificação do índice médio de perfusão sanguínea nos tumores, 5, 10 e 15 dias após a indução tumoral. * = $p < 0,05$. Valores expressos em média \pm SD. $n = 5 - 6$ animais por grupo, para cada tempo avaliado.

A



B

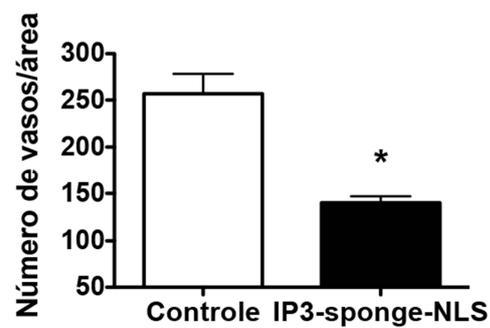


Figura 7. O tamponamento do Ca^{2+} nuclear leva a redução do número de vasos sanguíneos *in vivo*. (A) Imagens representativas de imunohistoquímica de cortes de tumores para a marcação de FVW. Setas pretas na imagem indicam marcação considerada positiva para a presença de vasos sanguíneos. Barra de escala = 50mm. (B) Quantificação do número de vasos nos tumores. * = $p < 0,05$. Valores expressos em média \pm SD. $n = 5$ animais por grupo e 5 campos randômicos avaliados por tumor.

O tamponamento do Ca^{2+} nuclear altera a expressão gênica em células de tumores de mama

Para desvendar o mecanismo através do qual o tamponamento do Ca^{2+} nuclear afeta a angiogênese tumoral, possíveis alterações na expressão gênica foram avaliadas através de ensaio de sequenciamento completo de RNA (RNASeq). De fato, o perfil de expressão gênica encontra-se alterado após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear, sendo mais semelhante entre as amostras do mesmo grupo: Controle (RFP1, RFP2, RFP3) e IP3-sponge-NLS (NLS1, NLS2, NLS3) e diferente entre os dois grupos experimentais avaliados (RFP e NLS), (Figura 8A). Diversos genes tiveram sua expressão regulada após o tamponamento de Ca^{2+} (Figura 8B) e diversos foram avaliados como diferencialmente expressos, ou seja, genes cuja expressão foi significativamente alterada (Figura 8B) para cima (*upregulated*) ou para baixo (*downregulated*) pelo tamponamento de Ca^{2+} (Figura 8B, C). Uma descrição detalhada sobre cada um dos genes alterados são fornecidas nas tabelas abaixo (Tabelas 1 e 2). A associação entre esses genes altamente regulados por Ca^{2+} (*upregulated e downregulated*) e o processo angiogênico, definida à partir da construção de uma via de angiogênese, revelou 6 principais genes que são regulados pelo Ca^{2+} nuclear e envolvidos no processo angiogênico. Entre eles, 5 genes encontram-se *upregulated*: transcription factor jun-B (JUNB), chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2), C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10), human dentin matrix acidic phosphoprotein gene (DMP1) e early growth response protein 1 (EGR-1) e 1 gene encontra-se *downregulated*: stanniocalcin 2 (STC2); (Figura 9).

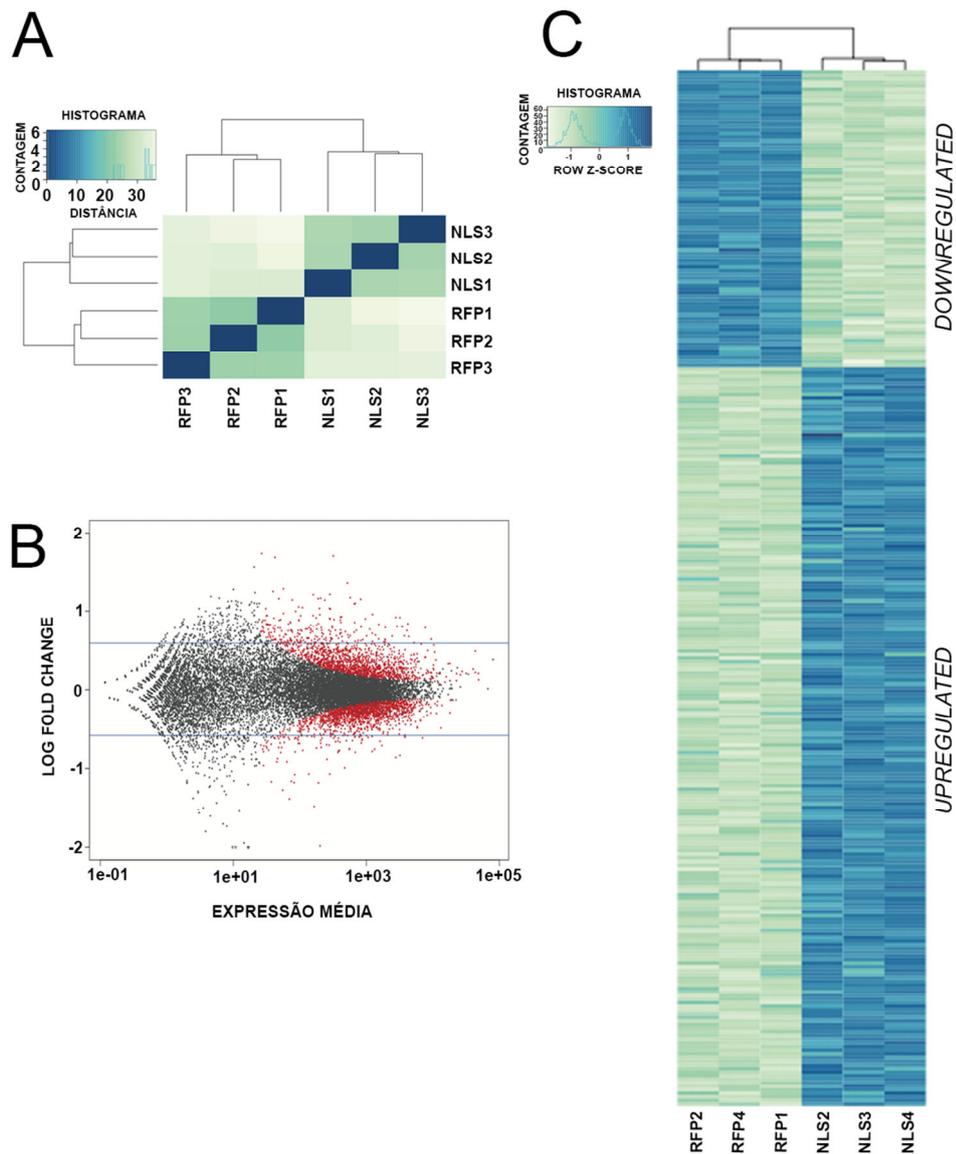


Figura 8. O tamponamento do Ca^{2+} nuclear altera a expressão gênica em células de tumores de mama. (A) Distância euclidiana entre os grupos experimentais representada segundo histograma de cores na imagem. Grupo controle = RFP1, RFP2 e RFP3; IP3-sponge-NLS = NLS1, NLS2 e NLS3. (B) Razão logarítmica em razão da expressão média de *reads*. Pontos vermelhos indicam genes diferencialmente expressos e linhas azuis horizontais representam o valor de corte de *2x fold change*; $p < 0,01$. Genes acima da linha azul superior = *upregulated* e abaixo da linha azul inferior = *downregulated*. (C) Mapa de cores indica a expressão gênica das amostras dos principais genes diferencialmente expressos após o tamponamento de Ca^{2+} ; tons mais escuros representam maiores níveis de expressão.

Tabela 1. Genes cuja expressão foi regulada para cima após o tamponamento do Ca²⁺ nuclear

Código Ensembl ^a	log2FoldChange ^b	Gene	Descrição
ENSMUSG00000000290	0,628133041	Itgb2	<i>Integrin beta-2</i>
ENSMUSG00000000627	1,032335318	Sema4f	<i>Semaphorin-4F</i>
ENSMUSG00000000791	0,652204631	Il12rb1	<i>Interleukin-12 receptor; subunit beta-1</i>
ENSMUSG00000001604	0,970185422	Tcea3	<i>Transcription elongation factor A; protein 3</i>
ENSMUSG00000003617	0,792793158	Cp	<i>Ceruloplasmin</i>
ENSMUSG00000005951	0,709229586	Shpk	<i>Sedoheptulokinase</i>
ENSMUSG00000005986	0,775239141	Ankrd13d	<i>Ankyrin repeat domain-containing protein 13 D</i>
ENSMUSG00000006403	0,589854915	Adamts4	<i>A disintegrin-like and metallopeptidase, thrombospondin 4</i>
ENSMUSG00000007039	0,65740248	Ddah2	<i>Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2</i>
ENSMUSG00000009145	0,746846955	Dqx1	<i>ATP-dependent RNA helicase DQX1</i>
ENSMUSG00000012428	0,608841204	Steap4	<i>STEAP family member 4</i>
ENSMUSG00000017390	0,667777492	Aldoc	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>
ENSMUSG00000017830	0,906806503	Dhx58	<i>DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58</i>
ENSMUSG00000017897	0,913716614	Eya2	<i>Eyes absent 2 homolog (Drosophila)</i>
ENSMUSG00000018916	1,158777374	Csf2	<i>Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>
ENSMUSG00000019102	0,732985103	Aldh3a1	<i>Aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1</i>
ENSMUSG00000020034	0,942371306	Tcp11l2	<i>T-complex 11 (mouse) like 2</i>
ENSMUSG00000020159	0,765017506	Gabrp	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi</i>
ENSMUSG00000020638	1,165140369	Cmpk2	<i>Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial</i>
ENSMUSG00000020641	1,150003618	Rsad2	<i>Radical S-adenosyl methionine domain containing 2</i>
ENSMUSG00000020865	0,747807143	Abcc3	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3</i>
ENSMUSG00000021025	0,622576087	Nfkbia	<i>NF-kappa-B inhibitor alpha (I-kappa-B-alpha) (Ikb-alpha)</i>
ENSMUSG00000021200	1,283190961	Asb2	<i>Ankyrin repeat and SOCS box-containing 2</i>
ENSMUSG00000021250	0,744330117	Fos	<i>Proto-oncogene c-Fos (cellular oncogene fos)</i>
ENSMUSG00000021792	0,687143748	Fam213a	<i>Redox-regulatory protein FAM213A</i>
ENSMUSG00000021876	0,617300923	Rnase4	<i>Ribonuclease 4 (Ribonuclease, RNase A family 4)</i>
ENSMUSG00000021903	1,212385572	Galnt15	<i>Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 15</i>
ENSMUSG00000021950	0,644060821	Anxa8	<i>Annexin A8</i>
ENSMUSG00000022037	0,670249459	Clu	<i>Clusterin</i>
ENSMUSG00000022126	1,033118703	Irg1	<i>Immuno-responsive gene 1</i>
ENSMUSG00000022159	0,62322765	Rab2b	<i>RAB2B, member RAS oncogene family</i>
ENSMUSG00000022425	1,045678748	Enpp2	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2</i>
ENSMUSG00000022773	0,744839736	Ypel1	<i>Yippee-like 1 (Drosophila)</i>
ENSMUSG00000023186	0,828255772	Vwa5a	<i>von Willebrand factor A domain containing; 5A</i>
ENSMUSG00000024063	0,607916178	Lbh	<i>Protein LBH (Limb bud and heart-expressed protein)</i>
ENSMUSG00000024164	0,743797332	C3	<i>Complement component 3</i>
ENSMUSG00000024299	0,695223207	Adamts10	<i>A disintegrin-like and metallopeptidase, thrombospondin 10</i>
ENSMUSG00000024381	0,707296079	Bin1	<i>Bridging integrator 1</i>
ENSMUSG00000025492	0,598473289	Ifitm3	<i>Interferon induced transmembrane protein 3</i>
ENSMUSG00000025498	1,140236052	Irf7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
ENSMUSG00000025887	0,701521795	Casp12	<i>Caspase 12</i>
ENSMUSG00000025888	0,671498561	Casp1	<i>Caspase 1</i>
ENSMUSG00000025921	0,76177749	Rdh10	<i>Retinol dehydrogenase 10</i>

Código Ensembl	log2 FoldChange	Gene	Descrição
ENSMUSG00000026222	0,715693093	Sp100	<i>Nuclear antigen Sp100</i>
ENSMUSG00000026259	1,159547953	Ngef	<i>Neuronal guanine nucleotide exchange fator</i>
ENSMUSG00000026463	0,820385752	Atp2b4	<i>ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 4</i>
ENSMUSG00000026535	0,597516833	Ak1	<i>Interferon activated gene 202B</i>
ENSMUSG00000026822	0,917102276	Lcn2	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
ENSMUSG00000027175	0,608322661	Tcp11l1	<i>T-complex 11 like 1</i>
ENSMUSG00000027247	0,777921959	Arhgap1	<i>Rho GTPase activating protein 1</i>
ENSMUSG00000027399	0,63263777	Il1a	<i>Interleukin-1 alpha (IL-1 alpha)</i>
ENSMUSG00000027456	0,648981668	Sdcbp2	<i>Syndecan binding protein (syntenin) 2</i>
ENSMUSG00000027514	1,03485901	Zbp1	<i>Z-DNA binding protein 1</i>
ENSMUSG00000028015	0,586811032	Ctso	<i>Cathepsin O</i>
ENSMUSG00000028037	1,209764117	Ifi44	<i>Interferon-induced protein 44</i>
ENSMUSG00000028268	1,029062937	Gbp3	<i>Guanylate binding protein 3</i>
ENSMUSG00000028269	1,09204039	Gbp1	<i>Guanylate binding protein 2, interferon-inducible</i>
ENSMUSG00000028270	1,100159143	Gbp2	<i>Interferon-induced guanylate-binding protein 2</i>
ENSMUSG00000028793	0,673119194	Rnf19b	<i>Ring finger protein 19B</i>
ENSMUSG00000029019	0,620792504	Nppb	<i>Natriuretic peptide type B</i>
ENSMUSG00000029093	0,649085593	Sorcs2	<i>Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2</i>
ENSMUSG00000029154	0,619598426	Cwh43	<i>PGAP2-interacting protein</i>
ENSMUSG00000029298	0,924472319	Gbp9	<i>Guanylate-binding protein 9</i>
ENSMUSG00000029304	0,78018225	Spp1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
ENSMUSG00000029307	0,889144372	Dmp1	<i>Dentin matrix protein 1</i>
ENSMUSG00000029380	0,677652925	Cxcl1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
ENSMUSG00000029561	0,957239425	Oas2	<i>2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2</i>
ENSMUSG00000029771	0,596077957	Irf5	<i>Interferon regulatory factor 5</i>
ENSMUSG00000029869	0,840100945	Ephb6	<i>Ephrin type-B receptor 6</i>
ENSMUSG00000030102	0,900497388	Itpr1	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1</i>
ENSMUSG00000030107	0,668756341	Usp18	<i>Ubiquitin specific peptidase 18</i>
ENSMUSG00000030630	0,816317046	Fah	<i>Fumarylacetoacetate hydrolase</i>
ENSMUSG00000030921	0,955656956	Trim30a	<i>Tripartite motif-containing 30A</i>
ENSMUSG00000030966	0,641860414	Trim21	<i>Tripartite motif-containing 21</i>
ENSMUSG00000031090	0,634722966	Nadsyn1	<i>NAD synthetase 1</i>
ENSMUSG00000031595	0,73085944	Pdgfrl	<i>Platelet-derived growth factor receptor-like</i>
ENSMUSG00000031750	0,632920751	Il34	<i>Interleukin 34</i>
ENSMUSG00000031778	0,795094444	Cx3cl1	<i>Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1</i>
ENSMUSG00000032192	0,603259978	Gnb5	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5</i>
ENSMUSG00000032377	0,749931001	Plscr4	<i>Phospholipid scramblase 4</i>
ENSMUSG00000032596	0,76468563	Uba7	<i>Ubiquitin-like modifier activating enzyme 7</i>
ENSMUSG00000032661	0,722618488	Oas3	<i>2'-5' oligoadenylate synthetase 3</i>
ENSMUSG00000033355	0,855232399	Rtp4	<i>Receptor transporter protein 4</i>
ENSMUSG00000034171	0,746892403	Faah	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>
ENSMUSG00000034394	0,638254164	Lif	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
ENSMUSG00000034459	1,698733509	Ifit1	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
ENSMUSG00000034675	0,605966812	Dbn1	<i>Drebrin 1</i>
ENSMUSG00000034855	1,143860272	Cxcl10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
ENSMUSG00000034917	0,650775828	Tjp3	<i>Tight junction protein 3</i>
ENSMUSG00000035042	1,357138648	Ccl2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>

Código Ensembl	log2 FoldChange	Gene	Descrição
ENSMUSG00000035692	0,926093418	Isg15	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>
ENSMUSG00000036534	0,63450423	Slc38a7	<i>Solute carrier family 38, member 7</i>
ENSMUSG00000036995	0,597592667	Asap3	<i>ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3</i>
ENSMUSG00000037032	0,749181694	Apbb1	<i>Amyloid beta precursor protein-binding, family B, member 1</i>
ENSMUSG00000037035	0,740001008	Inhbb	<i>Inhibin beta-B</i>
ENSMUSG00000037235	0,627916782	Mxd4	<i>Max dimerization protein 4</i>
ENSMUSG00000037348	0,586268127	Paqr7	<i>Progesterin and adipoQ receptor family member VII</i>
ENSMUSG00000037921	0,891919519	Ddx60	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60</i>
ENSMUSG00000038067	0,919139188	Csf3	<i>Colony stimulating factor 3 (granulocyte)</i>
ENSMUSG00000038178	0,730688402	Slc43a2	<i>Solute carrier family 43, member 2</i>
ENSMUSG00000038375	0,780351025	Trp53inp2	<i>Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 2</i>
ENSMUSG00000038418	1,171852899	Egr1	<i>Early growth response 1</i>
ENSMUSG00000038521	0,594587477	C1s1	<i>Complement component 1, s subcomponent 1</i>
ENSMUSG00000038797	0,658414246	Zscan2	<i>Zinc finger and SCAN domain containing 2</i>
ENSMUSG00000039253	0,712743294	Fn3krp	<i>Fructosamine 3 kinase related protein</i>
ENSMUSG00000039865	0,667939345	Slc44a3	<i>Solute carrier family 44, member 3</i>
ENSMUSG00000039934	0,851513283	Gsap	<i>Gamma-secretase activating protein</i>
ENSMUSG00000040253	0,714131382	Gbp7	<i>Guanylate binding protein 7</i>
ENSMUSG00000040264	1,248796236	Gbp5	<i>Guanylate binding protein 5</i>
ENSMUSG00000040483	0,942431545	Xaf1	<i>XIAP associated factor 1</i>
ENSMUSG00000042099	0,678123588	Kank3	<i>KN motif and ankyrin repeat domains 3</i>
ENSMUSG00000042115	0,741056926	Klhc8a	<i>Kelch domain containing 8A</i>
ENSMUSG00000042793	0,704398264	Lgr6	<i>Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6</i>
ENSMUSG00000045027	0,790735475	Prss22	<i>Protease, serine 22</i>
ENSMUSG00000045136	0,797216057	Tubb2b	<i>Tubulin, beta 2B class IIB</i>
ENSMUSG00000046447	0,591614961	Camk2n1	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1</i>
ENSMUSG00000046814	0,745389063	Gchfr	<i>GTP cyclohydrolase I feedback regulator</i>
ENSMUSG00000047180	0,783767654	Neurl3	<i>E3 ubiquitin-protein ligase NEURL3</i>
ENSMUSG00000048779	0,805419043	P2ry6	<i>Pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6</i>
ENSMUSG00000050578	0,679310911	Mmp13	<i>Matrix metalloproteinase 13</i>
ENSMUSG00000050957	0,641328669	Insl6	<i>Insulin-like peptide INSL6</i>
ENSMUSG00000052837	0,588551617	Junb	<i>Transcription factor jun-B (MyD21)</i>
ENSMUSG00000053835	0,617680574	H2-T24	<i>Histocompatibility 2, T region locus 24</i>
ENSMUSG00000054728	0,880911846	Phactr1	<i>Phosphatase and actin regulator 1</i>
ENSMUSG00000057137	0,780833214	Tmem140	<i>Transmembrane protein 140</i>
ENSMUSG00000057346	0,689168756	Apol9a	<i>Apolipoprotein L 9a</i>
ENSMUSG00000057969	0,83558487	Sema3b	<i>Sema domain, immunoglobulin domain , semaphorin 3B</i>
ENSMUSG00000058317	0,585891078	Ube2e2	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2</i>
ENSMUSG00000059824	0,617039635	Dbp	<i>D site albumin promoter binding protein</i>
ENSMUSG00000064215	0,853256696	Ifi27	<i>Interferon, alpha-inducible protein 27</i>
ENSMUSG00000066026	0,589271788	Dhrs3	<i>Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3</i>
ENSMUSG00000066720	1,052486963	Cldn9	<i>Claudin-9</i>
ENSMUSG00000067212	0,587810502	H2-T23	<i>Histocompatibility 2, T region locus 23</i>
ENSMUSG00000068245	0,745782588	Phf11	<i>PHD finger protein 11D</i>
ENSMUSG00000068246	0,618452895	Apol9b	<i>Apolipoprotein L 9b</i>
ENSMUSG00000069874	0,698026095	Irgm2	<i>Immunity-related GTPase family M member 2</i>
ENSMUSG00000071656	0,616926408	Lrrn4cl	<i>LRRN4 C-terminal like</i>

Código Ensembl	log2 FoldChange	Gene	Descrição
ENSMUSG00000072214	0,650129549	Sept5	<i>Septin 5</i>
ENSMUSG00000072620	0,899368447	Slfn2	<i>Schlafen 2</i>
ENSMUSG00000074896	1,681198521	Ifit3	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>
ENSMUSG00000078485	0,762214433	Plekhn1	<i>Pleckstrin homology domain 1</i>
ENSMUSG00000078771	0,997055051	Evi2a	<i>Ecotropic viral integration site 2a</i>
ENSMUSG00000078853	0,760398059	Igtp	<i>Interferon gamma induced GTPase</i>
ENSMUSG00000078920	0,696113103	Ifi47	<i>Interferon gamma inducible protein 47</i>
ENSMUSG00000079057	0,723439716	Cyp4v2	<i>Cytochrome P450, family 4, subfamily v, polypeptide 3</i>
ENSMUSG00000079363	0,746288686	Gbp4	<i>Guanylate binding protein 4</i>
ENSMUSG00000090877	0,886772542	Hspa1b	<i>Heat shock protein 1B</i>

^aCódigos de referências dos genes citados utilizando como referência o ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>); ^bmédia de expressão dos genes com relação ao corte utilizado de *log2 FoldChange*.

Tabela 2. Genes cuja expressão foi regulada para baixo após o tamponamento do Ca²⁺ nuclear

Código Ensembl ^a	log2FoldChange ^b	Gene	Descrição
ENSMUSG000000019	-0,621712434	Sipa1l2	<i>Signal-induced proliferation-associated 1 like 2</i>
ENSMUSG0000000196	-1,177313293	Sema6a	<i>Sema domain, semaphorin 6A</i>
ENSMUSG0000000199	-0,60615575	Kitlg	<i>Kit ligand (Hematopoietic growth factor KL)</i>
ENSMUSG0000000199	-0,602906949	Myb	<i>Myeloblastosis oncogene</i>
ENSMUSG0000000201	-0,754747688	Slc1a4	<i>Solute carrier family 1, member 4</i>
ENSMUSG0000000202	-0,917190067	Aldh1l2	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2</i>
ENSMUSG0000000203	-0,599775563	Stc2	<i>Stanniocalcin 2</i>
ENSMUSG0000000203	-0,588684762	Cdc34	<i>Cell division cycle 34</i>
ENSMUSG0000000205	-0,648726032	Myo19	<i>Myosin XIX</i>
ENSMUSG0000000212	-0,651169286	Ppp1r13b	<i>Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13B</i>
ENSMUSG0000000228	-1,070705436	Lmln	<i>Leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family)</i>
ENSMUSG0000000230	-0,79681941	Cdkn1a	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)</i>
ENSMUSG0000000248	-0,602801535	Eif1ad	<i>Eukaryotic translation initiation factor 1A domain containing</i>
ENSMUSG0000000251	-0,862351743	Loxl4	<i>Lysyl oxidase-like 4</i>
ENSMUSG0000000255	-0,591302412	Pidd1	<i>p53 induced death domain protein 1</i>
ENSMUSG0000000273	-0,993213094	Chac1	<i>ChaC, cation transport regulator 1</i>
ENSMUSG0000000277	-0,707625183	Slc7a11	<i>Solute carrier family 7, member 11</i>
ENSMUSG0000000282	-0,77856716	Ccne2	<i>Cyclin E2</i>
ENSMUSG0000000282	-0,884785106	Ndufaf4	<i>NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, assembly factor 4</i>
ENSMUSG0000000285	-0,598251182	Usp24	<i>Ubiquitin specific peptidase 24</i>
ENSMUSG0000000288	-1,070912388	Sesn2	<i>Sestrin 2</i>
ENSMUSG0000000294	-1,477892772	P2rx7	<i>Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7</i>
ENSMUSG0000000297	-0,759012739	Asns	<i>Asparagine synthetase</i>
ENSMUSG0000000314	-0,6686371	Slc25a15	<i>Mitochondrial carrier ornithine transporter, member 15</i>
ENSMUSG0000000317	-0,681569629	Gpt2	<i>Glutamic pyruvate transaminase 2</i>
ENSMUSG0000000319	-0,607600916	Aars	<i>Alanyl-tRNA synthetase</i>
ENSMUSG0000000322	-0,659551316	Glce	<i>Glucuronyl C5-epimerase</i>
ENSMUSG0000000323	-1,076961446	Col12a1	<i>collagen, type XII, alpha 1</i>
ENSMUSG0000000348	-0,599337936	Nudt19	<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19</i>
ENSMUSG0000000350	-0,683305313	Rrp12	<i>Ribosomal RNA processing 12 homolog (S. cerevisiae)</i>
ENSMUSG0000000358	-0,599419993	Polr3g	<i>Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G</i>
ENSMUSG0000000368	-0,743971095	Dna2	<i>DNA replication helicase 2 homolog</i>
ENSMUSG0000000384	-0,686192679	Higd1a	<i>HIG1 domain family, member 1A</i>
ENSMUSG0000000385	-0,776267518	Atf5	<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor AT</i>
ENSMUSG0000000385	-1,159135192	Ciart	<i>Circadian associated repressor of transcription</i>
ENSMUSG0000000386	-0,629736387	Ric1	<i>RAB6A GEF complex partner 1</i>
ENSMUSG0000000397	-1,272596764	Fam71f1	<i>Family with sequence similarity 71, member F1</i>
ENSMUSG0000000400	-0,595230426	Slc7a5	<i>solute carrier family 7, member 5</i>
ENSMUSG0000000404	-0,712142899	Spns2	<i>Spinster homolog 2</i>
ENSMUSG0000000405	-0,648190829	Btaf1	<i>B-TFIID transcription factor-associated</i>
ENSMUSG0000000413	-0,593533179	Pcf11	<i>Cleavage and polyadenylation factor subunit homolog</i>
ENSMUSG0000000417	-0,875003481	Gpr155	<i>G protein-coupled receptor 155</i>

Código Ensembl	log2 FoldChange	Gene	Descrição
ENSMUSG000000419	-0,686498919	Slc16a6	<i>Solute carrier family 16, member 6</i>
ENSMUSG000000434	-0,799086136	Otud1	<i>OTU domain containing 1</i>
ENSMUSG000000441	-0,64558483	Bcl2l15	<i>BCL2-like 15</i>
ENSMUSG000000449	-0,610960072	Znf367	<i>Zinc finger protein 367</i>
ENSMUSG000000480	-0,703177395	Ldlrad3	<i>Low density lipoprotein receptor class A domain containing 3</i>
ENSMUSG000000502	-0,758522972	Heatr1	<i>HEAT repeat containing 1</i>
ENSMUSG000000548	-1,984636828	Znf667	<i>Zinc finger protein 667</i>
ENSMUSG000000580	-0,79786437	Mdn1	<i>Midasin homolog (yeast)</i>
ENSMUSG000000622	-0,652214941	Rapgef2	<i>Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2</i>
ENSMUSG000000623	-1,382718682	Serpib2	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2</i>
ENSMUSG000000624	-0,663726453	Arf2	<i>ADP-ribosylation factor 2</i>
ENSMUSG000000627	-0,918061308	Kcnc3	<i>Potassium voltage gated channel, member 3</i>
ENSMUSG000000665	-0,621210216	Mfsd7b	<i>Major facilitator superfamily domain containing 7B</i>
ENSMUSG000000714	-0,774421222	Ccnb1ip1	<i>Cyclin B1 interacting protein 1</i>
ENSMUSG000000742	-0,607387157	Zfp568	<i>Zinc finger protein 568</i>
ENSMUSG000000871	-1,17990572	Plcx2	<i>phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain</i>

^aCódigos de referências dos genes citados utilizando como referência o ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>); ^bmédia de expressão dos genes com relação ao corte utilizado de *log2 FoldChange*.

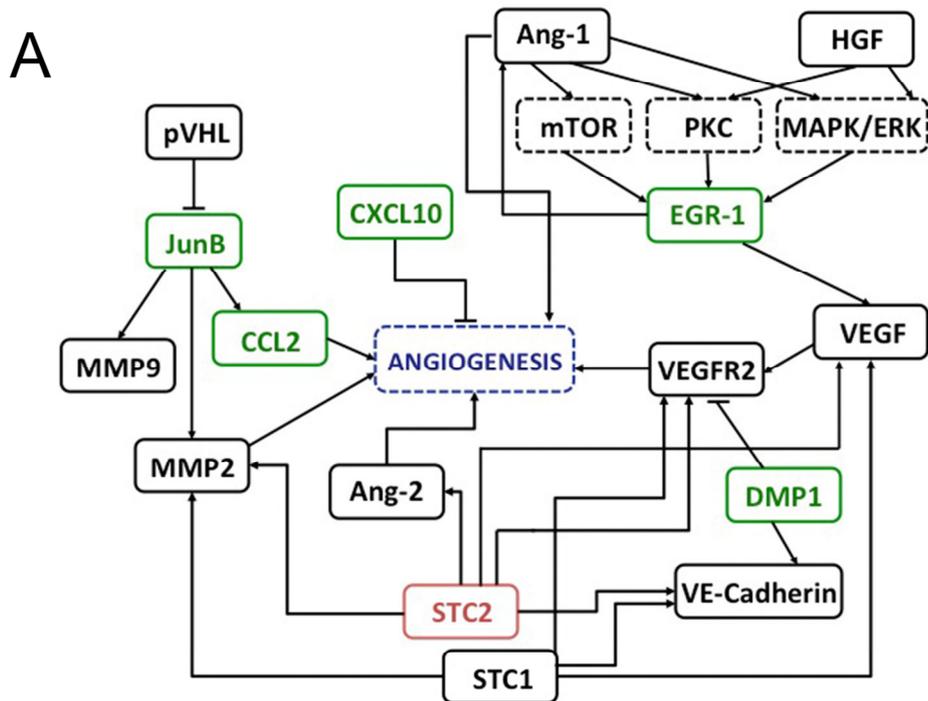


Figura 9. Via envolvendo os principais genes regulados pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear e envolvidos em angiogênese. (A) Via representativa das relações indiretas existentes entre os genes regulados por Ca^{2+} nuclear envolvidos na angiogênese. Retângulos representam produtos gênicos; retângulos verdes: genes *upregulated*; retângulos vermelhos: genes *downregulated*. Setas: relações de ativação; Barras-T: relações de repressão; Linhas pretas pontilhadas: vias de sinalização e linhas azuis representam o conceito de angiogênese.

O tamponamento do Ca²⁺ nuclear leva à superregulação de CXCL10

Entre os diversos genes modulados pelo tamponamento do Ca²⁺ nuclear, a quimiocina CXCL10 é amplamente conhecida como um potente angiostático [102-105]. Por isso, o aumento da expressão de CXCL10 foi avaliada para determinar a relação mecanística do tamponamento do Ca²⁺ nuclear e angiogênese. De fato, o tamponamento do Ca²⁺ nuclear leva ao aumento da expressão de CXCL10 (Figura 10A), conforme validado por PCR quantitativa (Controle = 1,000 ± 0,745; IP3-sponge-NLS = 82,12 ± 36, 74) e ao aumento de CXCL10 secretado (Controle = 40, 28 ± 6, 021; IP3-sponge-NLS = 175,5 ± 10,55), (Figura 10B). Esses resultados indicam que o tamponamento do Ca²⁺ nuclear limita a angiogênese devido à superregulação de CXCL10.

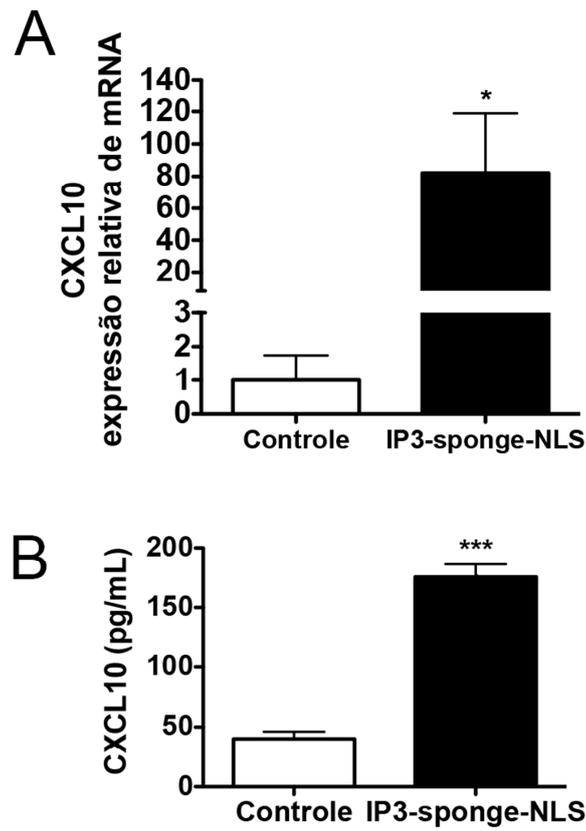


Figura 10. O tamponamento do Ca^{2+} nuclear leva à superregulação de CXCL10. (A) Média da expressão relativa de mRNA de CXCL10. (B) Níveis de secreção de CXCL10. * = $p < 0,05$. Valores expressos em média \pm SD.

O tamponamento do Ca^{2+} nuclear reduz a migração e a invasão celulares em tumores de mama triplo-negativos.

A regulação aberrante da migração celular norteia a progressão de diversas doenças, incluindo a invasão tumoral e o desenvolvimento de metástases [106]. O tamponamento do Ca^{2+} nuclear reduz a capacidade migratória celular, evidenciada pela reduzida capacidade das células em fecharem a ferida produzida em ensaio de *wound healing* (6 horas: Controle = $16,1 \pm 0,68180$ %; IP3-sponge-NLS = $12,84 \pm 1,214$ %; 24 horas: Controle = $50,31 \pm 3,392$ %; IP3-sponge-NLS = $37,84 \pm 2,332$ %), (Figura 11A, B). Além disso, o mapeamento do movimento das células (*tracking* celular) durante o processo de fechamento da fenda demonstra que as células perdem sua capacidade de motilidade após a redução do Ca^{2+} nuclear (Figura 12A), passando a executar movimentos randômicos, não direcionados, no próprio eixo. De fato, as células com o tamponador do Ca^{2+} nuclear percorrem menor distância, apresentam menor deslocamento e possuem menor direcionalidade de movimento (Figura 12B). Juntos, esses dados indicam que as células com tamponamento de Ca^{2+} nuclear possuem eficiência migratória significativamente menor do que aquelas com níveis normais de Ca^{2+} nuclear. Além das alterações na migração celular, a capacidade de invasão das células tumorais com tamponador também encontram-se reduzida (Controle = $8,119 \pm 1,172$ u.a.; IP3-sponge-NLS = $3,746 \pm 0,4243$ u.a.;) (Figura 12C). Portanto, a capacidade de motilidade celular encontra-se prejudicada após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear. Essas alterações foram confirmadas pela análise da morfologia das células ao longo do tempo: o tipo de movimento realizado pela células analisadas reflete a alteração da morfologia das células durante a migração após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear. As células passam a exibir um perfil estacionário, com forma arredondada. De fato, as células com o tamponador não desenvolvem prolongamentos e protruções e mantém morfologia estável ao longo do tempo (Figura 13A). Em conjunto, esses resultado indicam que a ablação dos sinais nucleares de Ca^{2+} alteram significativamente a capacidade migratória e invasiva das células tumorais.

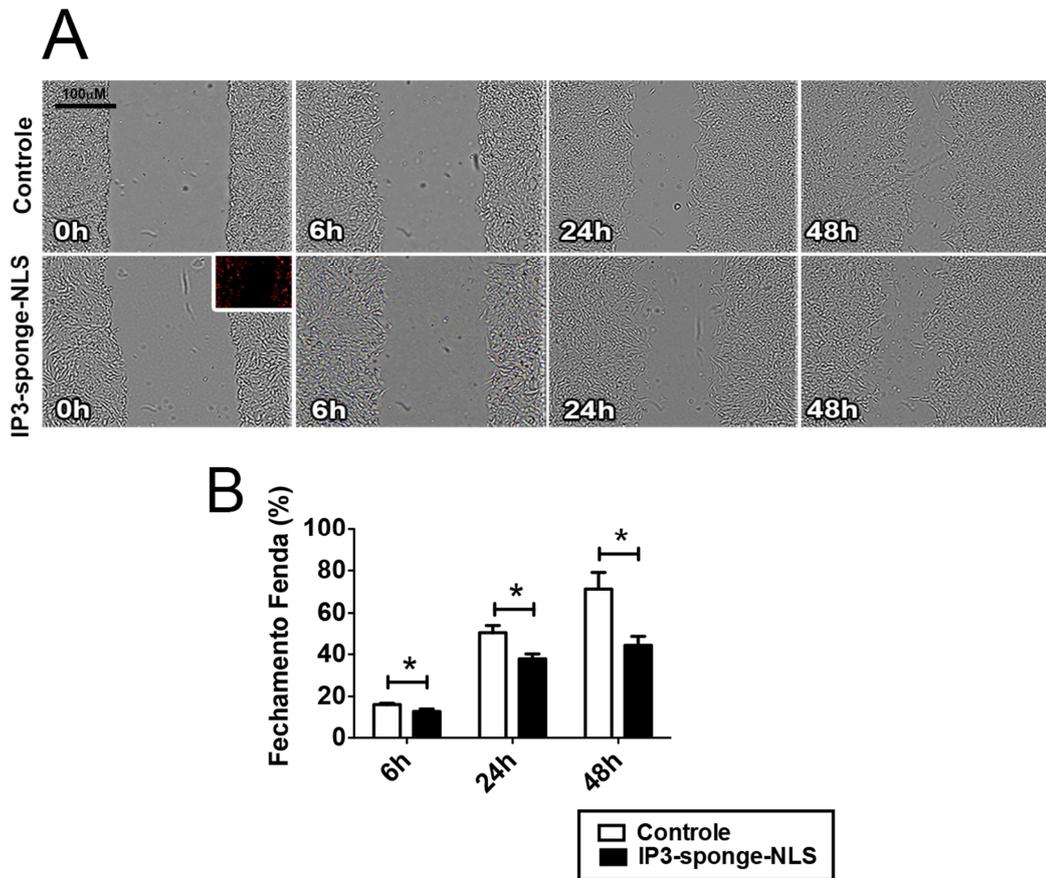


Figura 11. Ca^{2+} nuclear reduz a capacidade de migração em células de câncer de mama. (A) Imagens representativas do fechamento da fenda 0, 6, 24 e 48 horas após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear. Detalhe no painel inferior esquerdo mostra a presença do tamponador de Ca^{2+} nuclear nas células. Barra de escala = $100\mu\text{M}$. (B) Quantificação do fechamento da fenda após 6, 24 e 48 horas do tamponamento do Ca^{2+} nuclear. Dados apresentados com relação (%) à área da fenda no tempo inicial (0h). * = $p < 0,05$. Valores expressos em média \pm SD.

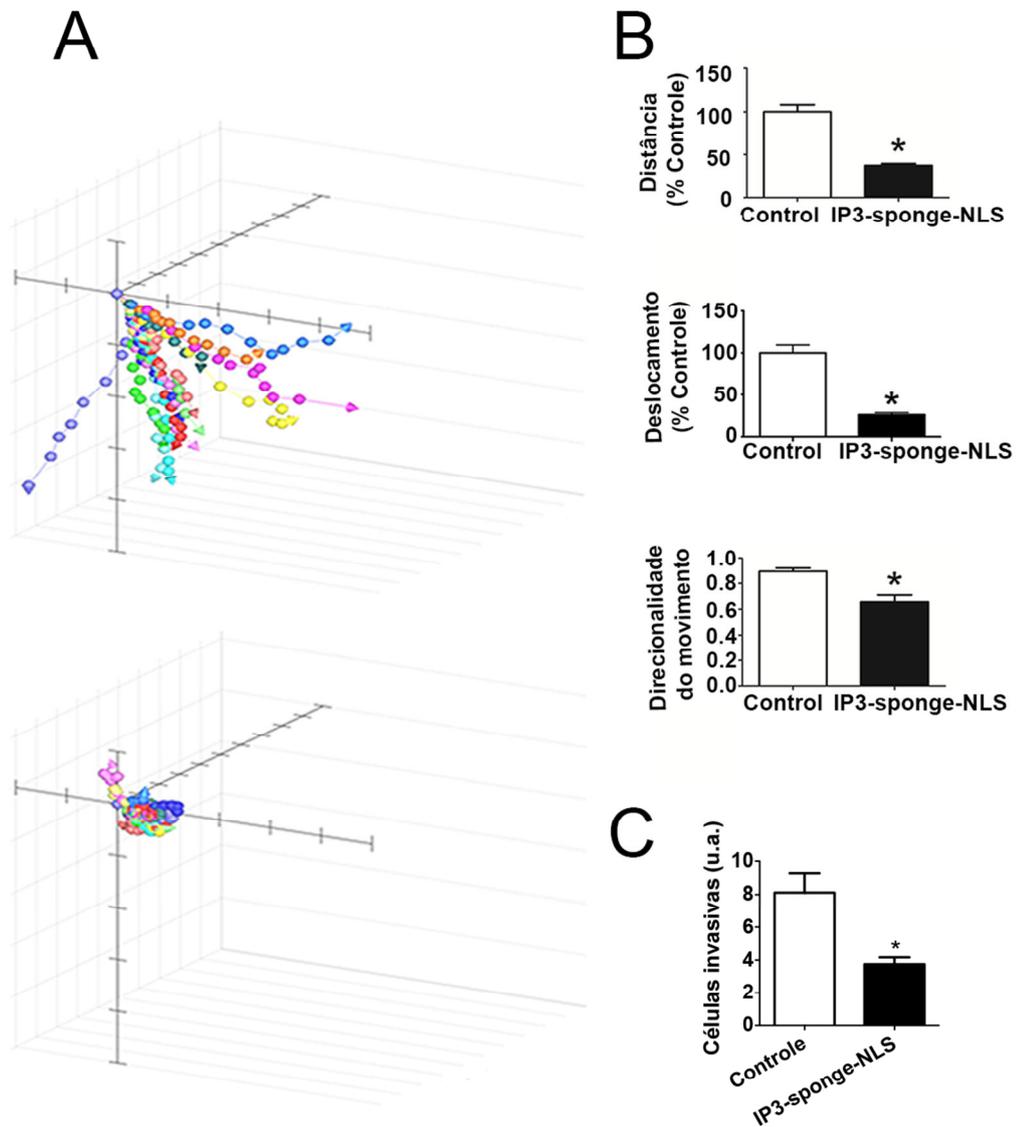


Figura 12. Redução do Ca^{2+} nuclear diminui a motilidade e a invasividade em células de câncer de mama. (A) *Tracking* individual de células, mostrando o caminho percorrido pelas células ao longo do tempo. Pontos coloridos indicam a posição de cada célula em cada frame ao longo de 4 horas, em intervalos de 20 minutos. $n = 20$ células/grupo. (B) Quantificação da média da distância e deslocamento percorridos pelas células e direcionalidade do movimento realizado. Dados apresentados com relação ao controle (%). (C) Quantidade média células invasivas em ensaio de Matrigel; * = $p < 0,05$. Valores expressos em média \pm SD.

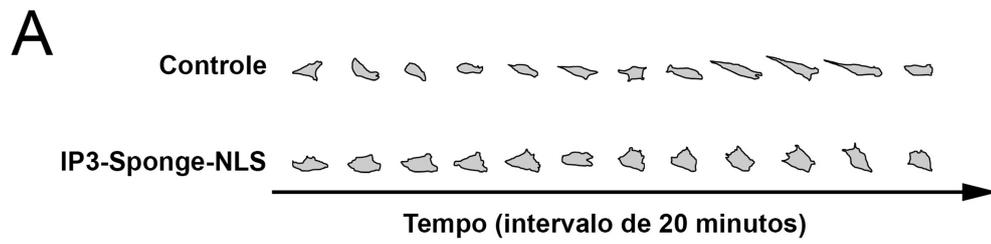


Figura 13. O tamponamento de Ca^{2+} nuclear altera a morfologia das células durante a migração. (A) Imagens representativas da forma celular ao longo do tempo. Imagens refletem a morfologia de células representativas em cada frame em intervalos de 20 minutos durante o total de 4 horas de análise.

Redução do Ca^{2+} nuclear aumenta a expressão de vinculina, parte do complexo de adesão focal celular.

Para desvendar o mecanismo através do qual as células se tornam menos móveis, a expressão da proteína vinculina foi avaliada, tendo em vista que células sem vinculina são menos aderentes e mais móveis [107]. A quantificação de vinculina por imunofluorescência mostrou o aumento da área de vinculina (Controle = $0,8441 \pm 0,1411$; IP3-sponge-NLS = $1,638 \pm 0,06375$); (Figuras 14A) e do número de pontos de expressão de vinculina (Controle = $29,03 \pm 4,746$; IP3-sponge-NLS = $63,67 \pm 3,281$); (Figura 14B), após o tamponamento de Ca^{2+} . Esses dados são corroborados pelo aumento da expressão da proteína vinculina, avaliado por western blot (Controle = $0,2490 \pm 0,06542$ u.a.; IP3-sponge-NLS = $0,5406 \pm 0,1042$ u.a.); (Figura 14C).

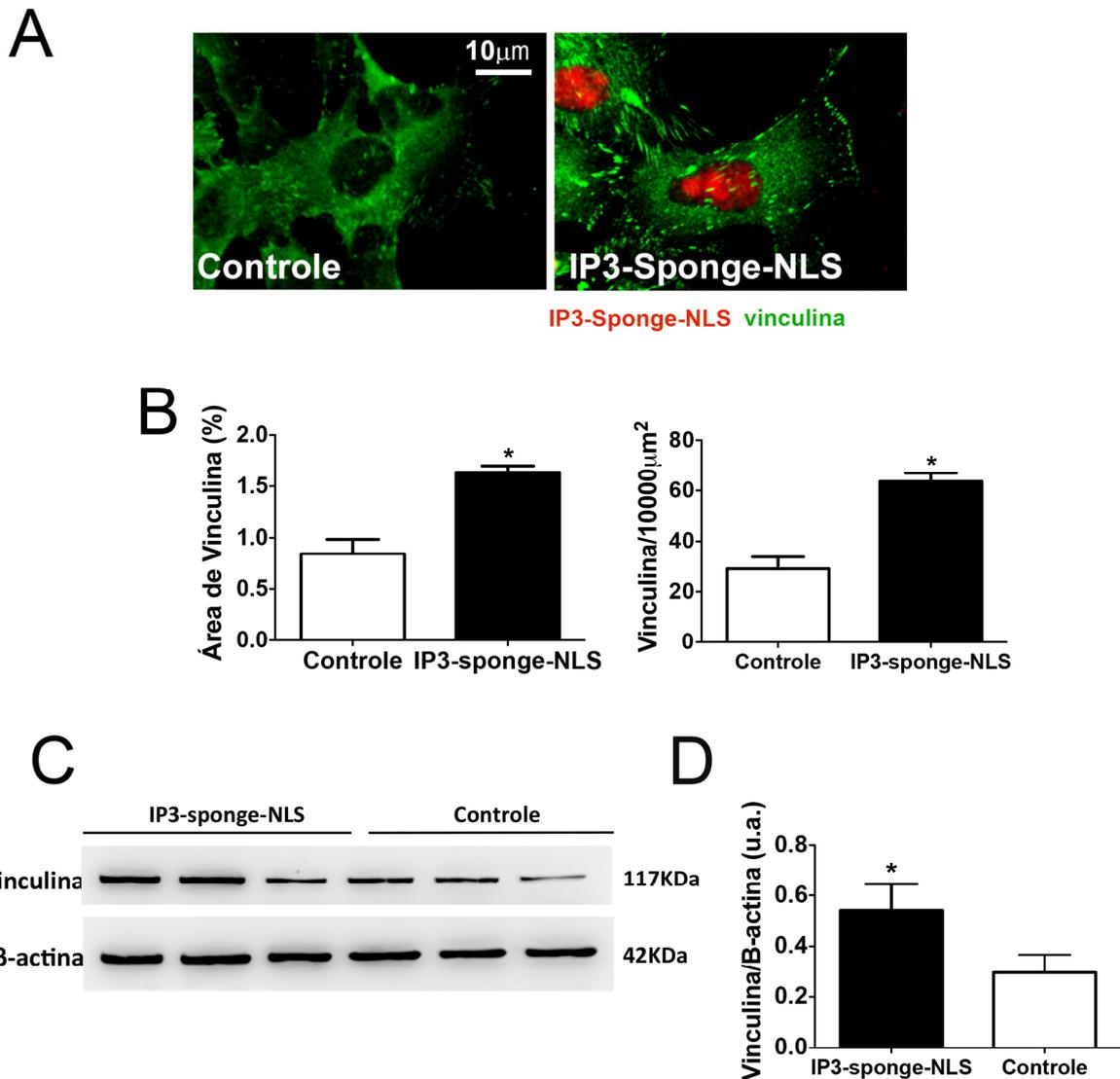


Figura 14. Adesão focal aumenta nas células tumorais após redução do Ca^{2+} nuclear. (A) Imagem representativa de imunofluorescência de células de tumor de mama marcadas com anticorpos específicos para vinculina (verde) e IP3-sponge-NLS (vermelho). Barra de escala = 10µm. (B) Quantificação da média da área de adesões focais e quantificação da média do número de adesões focais/10000µm² nas células tumorais; n = 20. (C) *Immunoblots* representativos do lisado total de proteínas de células 4T1, utilizando os anticorpos específicos indicados. β -actina utilizada como controle do *loading* de proteínas. Valores indicados normalizados pela expressão de β -actina (vinculina/ β -actina). * = p<0,05. Valores expressos em média \pm SD.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Apesar de progressos no que diz respeito ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, o câncer de mama permanece como uma doença fatal [108]. Entre os subtipos de câncer de mama, o subtipo triplo-negativo apresenta uma natureza altamente agressiva, com altas taxas de recidiva e menor sobrevida; tornando a busca por novos alvos terapêuticos para esse grupo extremamente urgente. Diversos estudos pré-clínicos e clínicos têm como objetivo o desenvolvimento de novos alvos para a doença. Entretanto, os resultados continuam controversos e impactos significativos na sobrevida dos pacientes ainda não foram demonstrados [59, 60]. Isso sugere que a inibição de uma única etapa do desenvolvimento tumoral possa ser subvertida pela ativação de rotas compensatórias, gerando impactos pouco significativos no resultado final da doença. Portanto, alvos terapêuticos eficazes em tratar mais de uma etapa da progressão tumoral podem ser uma alternativa atrativa para maximizar a eficiência dos tratamentos antitumorais. Nesse sentido, os resultados do presente trabalho indicam que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear impede o desenvolvimento tumoral, por seu papel em diversas etapas cruciais no desenvolvimento do câncer de mama, incluindo: (1) o crescimento, pela redução da proliferação e aumento da morte celular; (2) a angiogênese, pela redução do influxo sanguíneo tumoral e (3) a motilidade celular, pela redução da migração e invasão.

A redução dos sinais de Ca^{2+} especificamente nucleares comprometeu o crescimento do tumor primário de mama *in vivo*, corroborando resultados anteriores mostrando que a redução do Ca^{2+} nuclear impede de forma semelhante o crescimento de tumores hepáticos [17]. Nossos dados mostram que, apesar da redução na taxa de crescimento tumoral, não houve alteração significativa no peso dos animais durante o período de administração do tamponador de Ca^{2+} nuclear, indicando que não houve efeitos colaterais graves em decorrência da utilização da construção adenoviral como estratégia terapêutica. Mais estudos são necessários para avaliação da toxicidade porém, estudos anteriores mostraram que os efeitos do Ca^{2+} nuclear na proliferação de células tumorais não são observados em fibroblastos normais, sugerindo alguma seletividade do Ca^{2+} nuclear em regular o crescimento especificamente tumoral [46].

De forma geral, a redução do crescimento da massa tumoral, conforme observado após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear, poderia ser uma consequência de dois fatores: da

redução da proliferação e/ou da morte das células tumorais. De fato, a redução do Ca^{2+} nuclear leva à redução da proliferação e ao aumento da área de morte celular, fatores provavelmente responsáveis pelo controle do desbalanço no crescimento tumoral observado. Estudos anteriores mostraram que a redução do Ca^{2+} nuclear não induziu a morte de células por apoptose em adenocarcinoma hepático *in vitro* [17], fato por ser explicado pela ausência de resposta sistêmica em modelos *in vitro* ou, ainda, porque tumores triplo-negativos possuem como característica típica a formação de regiões necróticas na região central do tumor [109].

Com relação à proliferação, os resultados do presente trabalho corroboram diversas evidências demonstrando o papel do Ca^{2+} nuclear na proliferação celular. Por exemplo, estudos *in vitro* em células de hepatocarcinoma [17] e em carcinoma de células escamosas [46] mostraram que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear, sozinho ou em associação com a radioterapia, reduz a proliferação celular. Mais estudos são necessários para definir o mecanismo através do qual o Ca^{2+} no núcleo celular afeta a proliferação em câncer de mama; todavia, resultados prévios mostraram que o Ca^{2+} nuclear pode regular a proliferação celular impedindo a progressão no ciclo celular [17] e modular a atividade da região promotora de diversos genes envolvidos em proliferação [39, 85]. Além disso, estudos anteriores mostraram que o Ca^{2+} nuclear pode prevenir a superexpressão de receptores da família tirosina cinase e de membros da família das metaloproteínas que são induzidos por radiação [46], indicando assim mais um dos possíveis mecanismos pelo qual o Ca^{2+} nuclear afeta o crescimento tumoral.

Outro componente importante do papel do Ca^{2+} nuclear no crescimento tumoral, evidenciado pela primeira vez no presente trabalho, está na sua capacidade de regular a angiogênese tumoral. A redução da proliferação celular e aumento da morte celular podem ser provavelmente explicados pela indisponibilidade de nutrientes e oxigênio em decorrência da ausência de aporte vascular tumoral adequado após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear. Nossos resultados indicam que a redução da angiogênese tumoral é provavelmente o fator responsável pela conseqüente redução tumoral. Apesar da subversão dos efeitos antiangiogênicos no décimo quinto dia, provavelmente pelo reestabelecimento dos fatores antiangiogênicos regulados pelo tamponamento de Ca^{2+} , os efeitos da redução angiogênica no crescimento tumoral muito significantes. De fato, a limitação do crescimento tumoral pela redução da angiogênese corrobora diversos estudos mostrando que a

formação de novos vasos é necessária para a expansão de tumores [57, 110] e um componente crucial também na formação metastática [111].

O presente trabalho mostra que a regulação da angiogênese pelo Ca^{2+} nuclear ocorre em consequência a alterações que ocorrem no perfil de expressão gênica. De fato, diversos genes pró-angiogênicos, como a quimiocina CCL2 e o fator de transcrição EGR1 e antiangiogênicos com o CXCL10, sofrem alterações na sua expressão após o tamponamento do Ca^{2+} . Entretanto, os principais genes moduladores da angiogênese diferencialmente expressos após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear possuem efeitos que favorecem a angiogênese, fenótipo contrário àquele observado nos tumores avaliados. Nesse sentido, a superexpressão de CXCL10 possui importância significativa devido à sua reconhecida ação angiostática [103, 112] que provavelmente supera os efeitos pró-angiogênicos que possam ser gerados. Esse resultado corrobora estudos anteriores mostrando que CXCL10 é capaz de levar à dissociação de novos vasos, mesmo na presença de fatores pró-angiogênicos [113].

Apesar da necessidade de contenção do crescimento do tumor primário, a característica mais maligna de todos os cânceres é a sua habilidade de crescer além dos limites originais. Essa capacidade permite que as células entrem na circulação, por onde elas podem alcançar órgãos distantes e eventualmente formem tumores secundários [114]. Nossos resultados mostram pela primeira vez que a redução do Ca^{2+} nuclear limita a capacidade de migração e invasão celulares. Estes dados corroboram e expandem dados preliminares que mostram a importância do Ca^{2+} intracelular no processo de migração [92]. A relação direta desse íon com diversos fatores de crescimento [44, 84] indica que a redução do Ca^{2+} pode ser a responsável pelo comprometimento de cascatas de sinalização iniciadas pela ligação de fatores de crescimento, uma das formas mais relevantes de sinalização de motilidade em tumores [115]. Ainda, as alterações nos processos de migração e invasão celulares podem ser possivelmente explicados pela redução na formação de protruções de membrana após o tamponamento do Ca^{2+} nuclear, fato demonstrado pela morfologia arredondada das células após o tamponamento, semelhante àquele descrito para células imóveis [116]. A formação de estruturas migratórias e invasivas depende da regulação espacial e temporal dos filamentos de actina [117], um fator bastante sensível a mudanças no Ca^{2+} intracelular [118]. Portanto, a regulação dos filamentos do citoesqueleto de actina pode ser um dos mecanismos pelo qual o Ca^{2+} nuclear altera a polarização e despolarização celular, alterando sua motilidade.

As alterações na polarização celular e, conseqüentemente, nos processos de migração e invasão, podem ocorrer também em decorrência da alteração na expressão da proteína vinculina. De fato, o aumento da vinculina provavelmente mantém as células mais fortemente aderidas, o que poderia impedir o desenvolvimento de prolongamentos migratórios e, conseqüentemente, bloquear uma ou mais etapas da série de passos de adesão e perda de adesão que compõe o ciclo de migração celular. Ainda, clones celulares expressando altos níveis de vinculina têm sua capacidade de formar tumores palpáveis reduzida drasticamente [119], sugerindo que o aumento de vinculina causado pelo tamponamento do Ca^{2+} nuclear pode ter efeitos não apenas na migração celular, mas também nos efeitos observados no crescimento tumoral. De fato, outros estudos implicam o aumento de vinculina à inibição da invasão celular e à metástase [72] e à redução da migração celular [75]. É possível que o Ca^{2+} nuclear altere a migração celular também indiretamente, através da regulação de algumas das moléculas celulares ligadas às adesões focais, como integrinas e caderinas, conhecidamente reguladas por Ca^{2+} [120, 121]. Mais estudos são necessários para determinar essas relações, mas é possível sugerir que o Ca^{2+} nuclear possa alterar as propriedades físicas, a organização e a composição da matriz extracelular, fatores que afetariam a capacidade de migração celular. Os mecanismos através dos quais o Ca^{2+} nuclear regula a migração celular devem ser investigados, especialmente porque alvos terapêuticos que regulam a motilidade são particularmente importantes na plasticidade das células tumorais. Impedir não apenas um, mas diversos processos associados à motilidade, seria um importante avanço em termos de terapia.

Como cada passo da cascata metastática é considerado como um fator limitante [68], o Ca^{2+} nuclear pode ser implicado também como um possível regulador do processo metastático, tendo em vista sua influência em diversos passos que compõe essa cascata. Mais estudos são necessários para determinar o papel do Ca^{2+} nuclear na formação de metástases. Entretanto, é possível sugerir que a redução da capacidade migratória celular restringe de forma significativa a probabilidade de uma célula tumoral chegar até a circulação e formar colônias.

O desenvolvimento de alvos terapêuticos mais eficientes é de extrema importância, especialmente no caso do subtipo triplo-negativo, devido à ausência de alvos eficazes para terapia. Por tratar-se de um câncer negativo para a expressão de receptores hormonais, a resistência à terapia é comum e os resultados clínicos continuam insatisfatórios. Em

conjunto, os resultados do trabalho fornecem evidências significativas do envolvimento do Ca^{2+} nuclear na progressão do câncer de mama triplo-negativo, especialmente por regular angiogênese e motilidade celular, e oferece um alvo promissor para novas terapias antitumorais.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O presente trabalho fornece fortes evidências do envolvimento do Ca^{2+} nuclear na progressão tumoral, especialmente devido ao seu papel na angiogênese e na migração celular em câncer de mama triplo-negativo, dois importantes passos do desenvolvimento tumoral. Portanto, o tamponamento do Ca^{2+} nuclear pode ser considerado um alvo potencial para o tratamento de câncer de mama triplo-negativo, por controlar não só o crescimento do tumor primário, mas também diversos passos da cascata da progressão tumoral.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi realizada uma série de experimentos que envolveram diversas abordagens, incluindo experimentos interdisciplinares compreendendo áreas como Fisiologia, Medicina Molecular e Física, com o intuito de analisar a participação do Ca^{2+} nuclear em diversas etapas do desenvolvimento de tumores de mama-negativos. Foram realizados diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo e os resultados mostram que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear afeta diversas etapas do desenvolvimento tumoral. A redução do Ca^{2+} nuclear levou à repressão do crescimento tumoral *in vivo*, devido provavelmente ao aumento da área de morte celular e redução da proliferação celular nos tumores. Foi mostrado também que a redução do Ca^{2+} leva à diminuição da formação de novos vasos nos tumores, reduzindo de forma significativa a angiogênese tumoral, principalmente devido à superexpressão do angiostático CXCL10. Além de influenciar o crescimento do tumor primário, o tamponamento do Ca^{2+} nuclear foi também implicado como um importante fator da regulação da motilidade celular em câncer de mama. Além disso, foi mostrado o envolvimento do Ca^{2+} nuclear na capacidade de invasão e na alteração de expressão da proteína vinculina, uma das principais proteínas ligada à adesão celular. Em conjunto, estes resultados evidenciam o papel fundamental do Ca^{2+} nuclear no desenvolvimento câncer de mama triplo-negativo, através da regulação do crescimento tumoral, angiogênese e motilidade celulares. Neste sentido, o tamponamento do Ca^{2+} nuclear pode ser considerado com um alvo promissor para futuras terapias antitumorais, especialmente por limitar não somente o crescimento tumoral primário, mas também diversos passos da cascata metastática.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Tendo em vista o papel do Ca^{2+} nuclear na angiogênese tumoral e como regulador de migração e invasão em células tumorais, alguns dos principais passos da metástase tumoral, a avaliação da capacidade metastática seria um passo relevante para o desenvolvimento e continuação do presente trabalho. Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que o Ca^{2+} nuclear pode ser um importante regulador da metástase tumoral, mas mais resultados são necessários para averiguar a possível capacidade do Ca^{2+} nuclear em regular a formação de metástase. É plausível hipotetizar que o tamponamento do Ca^{2+} nuclear levaria a uma redução da formação de metástases. Nesse sentido, experimentos nessa área seriam extremamente importantes e poderiam significar um possível alvo de tratamento, mesmo em condições mais avançadas do desenvolvimento tumoral.

Outro possível ponto a ser considerado à partir desses resultados, seria a avaliação da modulação do sistema imune pelo Ca^{2+} nuclear. Seria importante avaliar os efeitos do tamponamento do Ca^{2+} nuclear no sistema imune, especialmente tendo em vista que diversos genes associados à resposta imune, como quimiocinas, por exemplo, são alterados pela redução dos sinais de Ca^{2+} nuclear e possuem relevância direta em diversos pontos do desenvolvimento tumoral avaliados no trabalho. A compreensão dessas vias pode levar ao entendimento mais profundo de outros mecanismos associados ao Ca^{2+} nuclear no desenvolvimento de tumores.

Outro aspecto relevante a ser avaliado futuramente seria a participação do Ca^{2+} nuclear no desenvolvimento de outros tipos de tumores, especialmente aqueles de difícil tratamento, como por exemplo, aqueles tumores associados mais diretamente à resistência quimioterápica. Nesse sentido, experimentos que avaliem formas específicas de *delivery* da construção tamponadora nas células especificamente tumorais seriam também bastante relevantes.

O presente trabalho abre a possibilidade de diversas novas perspectivas e mostra-se extremamente relevante no que diz respeito ao desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McPherson, K., C.M. Steel, and J.M. Dixon, *ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics*. BMJ, 2000. **321**(7261): p. 624-8.
2. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
3. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
4. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
5. Carey, L., et al., *Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?* Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(12): p. 683-92.
6. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4429-34.
7. Hugh, J., et al., *Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial*. J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1168-76.
8. Kim, J.Y., et al., *Treatment outcome in patients with triple negative early stage breast cancers compared with other molecular subtypes*. Radiat Oncol J, 2012. **30**(3): p. 124-31.
9. O'Toole, S.A., et al., *Therapeutic targets in triple negative breast cancer*. J Clin Pathol, 2013. **66**(6): p. 530-42.
10. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
11. Miyazaki, S., et al., *Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs*. Dev Biol, 1993. **158**(1): p. 62-78.
12. Kono, T., et al., *A cell cycle-associated change in Ca²⁺ releasing activity leads to the generation of Ca²⁺ transients in mouse embryos during the first mitotic division*. J Cell Biol, 1996. **132**(5): p. 915-23.
13. Chang, D.C. and C. Meng, *A localized elevation of cytosolic free calcium is associated with cytokinesis in the zebrafish embryo*. J Cell Biol, 1995. **131**(6 Pt 1): p. 1539-45.
14. Buonanno, A. and R.D. Fields, *Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development*. Curr Opin Neurobiol, 1999. **9**(1): p. 110-20.
15. Resende, R.R., et al., *Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 14.
16. Rodrigues, M.A., et al., *Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes*. Hepatology, 2008. **48**(5): p. 1621-31.

17. Rodrigues, M.A., et al., *Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation*. J Biol Chem, 2007. **282**(23): p. 17061-8.
18. Chawla, S., et al., *CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1505-9.
19. Sheng, M., M.A. Thompson, and M.E. Greenberg, *CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases*. Science, 1991. **252**(5011): p. 1427-30.
20. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.
21. Berridge, M.J., *The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle*. Cell Calcium, 2002. **32**(5-6): p. 235-49.
22. Echevarria, W., et al., *Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 440-6.
23. Malhas, A., C. Goulbourne, and D.J. Vaux, *The nucleoplasmic reticulum: form and function*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(6): p. 362-73.
24. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature, 1993. **361**(6410): p. 315-25.
25. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 1995. **80**(2): p. 259-68.
26. Rosemlit, N., et al., *Intracellular calcium release channel expression during embryogenesis*. Dev Biol, 1999. **206**(2): p. 163-77.
27. Lanner, J.T., et al., *Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(11): p. a003996.
28. Roderick, H.L., M.J. Berridge, and M.D. Bootman, *Calcium-induced calcium release*. Curr Biol, 2003. **13**(11): p. R425.
29. Rossi, D., et al., *RyR1 and RyR3 isoforms provide distinct intracellular Ca²⁺ signals in HEK 293 cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 12): p. 2497-504.
30. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(6): p. 933-40.
31. Foskett, J.K., et al., *Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 593-658.
32. Tu, H., et al., *Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms*. Biophys J, 2005. **88**(2): p. 1046-55.
33. Cardy, T.J., D. Traynor, and C.W. Taylor, *Differential regulation of types-1 and -3 inositol trisphosphate receptors by cytosolic Ca²⁺*. Biochem J, 1997. **328 (Pt 3)**: p. 785-93.
34. Hagar, R.E., et al., *Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium*. Nature, 1998. **396**(6706): p. 81-4.
35. Gerasimenko, O.V., et al., *ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope*. Cell, 1995. **80**(3): p. 439-44.
36. Malviya, A.N., P. Rogue, and G. Vincendon, *Stereospecific inositol 1,4,5-[³²P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol*

- trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9270-4.
37. Nicotera, P., et al., *An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ pool in liver nuclei.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6858-62.
 38. Leite, M.F., et al., *Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2975-80.
 39. Pusl, T., et al., *Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium.* J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27517-27.
 40. Rizzo, M.T. and G. Weber, *1-Phosphatidylinositol 4-kinase: an enzyme linked with proliferation and malignancy.* Cancer Res, 1994. **54**(10): p. 2611-4.
 41. Benzaquen, L.R., et al., *Clotrimazole inhibits cell proliferation in vitro and in vivo.* Nat Med, 1995. **1**(6): p. 534-40.
 42. Haverstick, D.M., et al., *Inhibition of human prostate cancer proliferation in vitro and in a mouse model by a compound synthesized to block Ca²⁺ entry.* Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 1002-8.
 43. Gao, B., et al., *Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2).* J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12237-42.
 44. Gomes, D.A., et al., *c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals.* J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4344-51.
 45. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
 46. Andrade LM, G.J., Gonçalves OX, Leite MTT, Catarina AM, et al. , *Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma to Anticancer Therapy.* J Cancer Sci Ther, 2012. **4**: p. 131-139.
 47. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.* Nature, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
 48. Mattern, J. and M. Volm, *Imbalance of cell proliferation and apoptosis during progression of lung carcinomas.* Anticancer Res, 2004. **24**(6): p. 4243-6.
 49. Amaravadi, R.K. and C.B. Thompson, *The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(24): p. 7271-9.
 50. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
 51. Greeve, M.A., et al., *Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by 5alpha-dihydrotestosterone; a role for p21(Cip1/Waf1).* J Mol Endocrinol, 2004. **32**(3): p. 793-810.
 52. Brem, S., et al., *Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous.* Cancer Res, 1976. **36**(8): p. 2807-12.
 53. Folkman, J., *Angiogenesis and apoptosis.* Semin Cancer Biol, 2003. **13**(2): p. 159-67.
 54. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization.* J Exp Med, 1972. **136**(2): p. 261-76.

55. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
56. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
57. Folkman, J., *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol, 1992. **3**(2): p. 65-71.
58. Ferrara, N. and R.S. Kerbel, *Angiogenesis as a therapeutic target*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 967-74.
59. Cameron, D., et al., *Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(10): p. 933-42.
60. Rossari, J.R., et al., *Bevacizumab and Breast Cancer: A Meta-Analysis of First-Line Phase III Studies and a Critical Reappraisal of Available Evidence*. J Oncol, 2012. **2012**: p. 417673.
61. Sporn, M.B., *The war on cancer*. Lancet, 1996. **347**(9012): p. 1377-81.
62. Reig, G., E. Pulgar, and M.L. Concha, *Cell migration: from tissue culture to embryos*. Development, 2014. **141**(10): p. 1999-2013.
63. Evans, J.H. and J.J. Falke, *Ca²⁺ influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(41): p. 16176-81.
64. Wei, C., et al., *Calcium flickers steer cell migration*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 901-5.
65. Faouzi, M., et al., *Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells*. J Cell Physiol, 2011. **226**(2): p. 542-51.
66. Feng, M., et al., *Store-independent activation of Orai1 by SPCA2 in mammary tumors*. Cell, 2010. **143**(1): p. 84-98.
67. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
68. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
69. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
70. Gupta, G.P. and J. Massague, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. **127**(4): p. 679-95.
71. Humphries, J.D., et al., *Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin*. J Cell Biol, 2007. **179**(5): p. 1043-57.
72. Subauste, M.C., et al., *Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein beta-catenin with the scaffolding protein MAGI-2*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5676-81.
73. Somiari, R.I., et al., *High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast*. Proteomics, 2003. **3**(10): p. 1863-73.

74. Yang, H.J., et al., *Focal adhesion plaque associated cytoskeletons are involved in the invasion and metastasis of human colorectal carcinoma*. *Cancer Invest*, 2010. **28**(2): p. 127-34.
75. Coll, J.L., et al., *Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(20): p. 9161-5.
76. Goldmann, W.H., et al., *Motility of vinculin-deficient F9 embryonic carcinoma cells analyzed by video, laser confocal, and reflection interference contrast microscopy*. *Exp Cell Res*, 1995. **221**(2): p. 311-9.
77. Lifschitz-Mercer, B., et al., *Expression of the adherens junction protein vinculin in human basal and squamous cell tumors: relationship to invasiveness and metastatic potential*. *Hum Pathol*, 1997. **28**(11): p. 1230-6.
78. Li, T., et al., *Loss of vinculin and membrane-bound beta-catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer*. *Mol Cancer*, 2014. **13**: p. 263.
79. Steeg, P.S., *Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges*. *Nat Med*, 2006. **12**(8): p. 895-904.
80. Mehta, R.R., et al., *Efficacy and mechanism of action of Deguelin in suppressing metastasis of 4T1 cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2013. **30**(7): p. 855-66.
81. Quang, C.T., et al., *The calcineurin/NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells*. *Cell Death Dis*, 2015. **6**: p. e1658.
82. Arantes, L.A., et al., *Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate is a necessary and conserved signal for the induction of both pathological and physiological cardiomyocyte hypertrophy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **53**(4): p. 475-86.
83. Varnai, P., et al., *Inositol lipid binding and membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(30): p. 27412-22.
84. Amaya, M.J., et al., *The insulin receptor translocates to the nucleus to regulate cell proliferation in liver*. *Hepatology*, 2014. **59**(1): p. 274-83.
85. Andrade, V., et al., *Nucleoplasmic calcium regulates cell proliferation through legumain*. *J Hepatol*, 2011. **55**(3): p. 626-35.
86. Vandenberghe, M., et al., *ORAI1 calcium channel orchestrates skin homeostasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(50): p. E4839-48.
87. Souza, C.M., et al., *Carboplatin delays mammary cancer 4T1 growth in mice*. *Pathol Res Pract*, 2013. **209**(1): p. 24-9.
88. Kawano, K., et al., *Adrenal tumor volume in a genetically engineered mouse model of neuroblastoma determined by magnetic resonance imaging*. *Exp Ther Med*, 2012. **4**(1): p. 61-64.
89. Zayed, M.A., et al., *Tumor growth and angiogenesis is impaired in CIB1 knockout mice*. *J Angiogenes Res*, 2010. **2**: p. 17.

90. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.
91. Wilisch-Neumann, A., et al., *Re-evaluation of cytostatic therapies for meningiomas in vitro*. J Cancer Res Clin Oncol, 2014. **140**(8): p. 1343-52.
92. Tsai, F.C., et al., *A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(2): p. 133-44.
93. Hagar, R.E. and B.E. Ehrlich, *Regulation of the type III InsP3 receptor and its role in beta cell function*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(13-14): p. 1938-49.
94. Fan, Y., et al., *Focal adhesion dynamics are altered in schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2013. **74**(6): p. 418-26.
95. Avalos, A.M., et al., *Aggregation of integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 39139-45.
96. Fontaine, J.F., et al., *MedlineRanker: flexible ranking of biomedical literature*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Web Server issue): p. W141-6.
97. Barbosa-Silva, A., et al., *PESCADOR, a web-based tool to assist text-mining of biointeractions extracted from PubMed queries*. BMC Bioinformatics, 2011. **12**: p. 435.
98. Donnard, E., et al., *Preimplantation development regulatory pathway construction through a text-mining approach*. BMC Genomics, 2011. **12 Suppl 4**: p. S3.
99. van Iersel, M.P., et al., *Presenting and exploring biological pathways with PathVisio*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 399.
100. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
101. Malviya, A.N., *The nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors*. Cell Calcium, 1994. **16**(4): p. 301-13.
102. Angiolillo, A.L., et al., *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 155-62.
103. Arenberg, D.A., et al., *Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 981-92.
104. Sgadari, C., A.L. Angiolillo, and G. Tosato, *Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10*. Blood, 1996. **87**(9): p. 3877-82.
105. Yang, J. and A. Richmond, *The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan*. Mol Ther, 2004. **9**(6): p. 846-55.
106. Condeelis, J., R.H. Singer, and J.E. Segall, *The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 695-718.

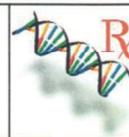
107. Gu, S., et al., *Activation of membrane androgen receptors in colon cancer inhibits the prosurvival signals Akt/bad in vitro and in vivo and blocks migration via vinculin/actin signaling*. Mol Med, 2011. **17**(1-2): p. 48-58.
108. Tao, Z., et al., *Breast Cancer: Epidemiology and Etiology*. Cell Biochem Biophys, 2014.
109. Dogan, B.E. and L.W. Turnbull, *Imaging of triple-negative breast cancer*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 6**: p. vi23-9.
110. Folkman, J., *Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors*. Ann Surg, 1972. **175**(3): p. 409-16.
111. Weidner, N., et al., *Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **324**(1): p. 1-8.
112. Feldman, A.L., et al., *Retroviral gene transfer of interferon-inducible protein 10 inhibits growth of human melanoma xenografts*. Int J Cancer, 2002. **99**(1): p. 149-53.
113. Bodnar, R.J., et al., *IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 2064-77.
114. Zetter, B.R., *Angiogenesis and tumor metastasis*. Annu Rev Med, 1998. **49**: p. 407-24.
115. Wells, A., *Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility*. Adv Cancer Res, 2000. **78**: p. 31-101.
116. Yamaguchi, H. and J. Condeelis, *Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(5): p. 642-52.
117. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 2003. **112**(4): p. 453-65.
118. Furukawa, R., et al., *Calcium regulation of actin crosslinking is important for function of the actin cytoskeleton in Dictyostelium*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 1): p. 187-96.
119. Rodriguez Fernandez, J.L., et al., *Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA*. J Cell Biol, 1992. **119**(2): p. 427-38.
120. Sjaastad, M.D. and W.J. Nelson, *Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium*. Bioessays, 1997. **19**(1): p. 47-55.
121. Kim, S.A., et al., *Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell-cell junctions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(24): p. 9857-62.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA ERIKA SOUSA GUIMARAES - 2012786060

Realizou-se, no dia 22 de fevereiro de 2016, às 14:00 horas, ICB, Departamento de Fisiologia e Biofísica, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Sinais nucleares de cálcio dependentes de Inositol 1,4,5-trisfosfato são necessários para a angiogênese e migração celular em tumores de mama triplo-negativos*, apresentada por ERIKA SOUSA GUIMARAES, número de registro 2012786060, graduada no curso de CIENCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Maria de Fatima Leite - Orientadora (UFMG), Prof. Andre Ricardo Massensini (UFMG), Prof. Jose Miguel Ortega (UFMG), Prof(a). Andrea Teixeira (Centro de Pesquisa René Rachou), Prof(a). Cristiane Rodrigues Corrêa (Faculdade de Ciências Médicas).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2016.


Prof(a). Maria de Fatima Leite


Prof(a). Andre Ricardo Massensini


Prof(a). Jose Miguel Ortega


Prof(a). Andrea Teixeira


Prof(a). Cristiane Rodrigues Corrêa