UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Paula Rhana Queiroz Araújo

“DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DE TUMORES DA MAMA: ONDE O Ca^{2+} SE ENCONTRA COM O AMPc.”

Belo Horizonte

2021

Paula Rhana Queiroz Araújo

"DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DE TUMORES DA MAMA: ONDE O CA^{2+} SE ENCONTRA COM O AMPC."

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia (Área de Concentração: Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz.

Coorientador: Dra. Andréia Laura P. Rodrigues.

Belo Horizonte

2021

043 Araujo, Paula Rhana Queiroz.
Desenvolvimento e progressão de tumores da mama: onde o ca2+ se encontra com o AMPc [manuscrito] / Paula Rhana Queiroz Araujo. – 2021.
92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Jader dos Santos Cruz.Co-orientador: Andréia Laura Prates Rodrigues.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Canais Iônicos. 4. Monofosfato de Adenosina. 5. Canais de Cálcio. I. Cruz, Jader dos Santos. II. Rodrigues, Andréia Laura Prates. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1

Ficha catalografica elaborada por Fabiane C. M. Reis – CRB/6 - 2680

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE PAULA RHANA QUEIROZ ARAÚJO. Aos nove dias do mês de dezembro de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma "on line", utilizando a plataforma "Teams", no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Desenvolvimento e progressão de tumores da mama: onde o Ca2+ se encontra com o AMPc", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Jader dos Santos Cruz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Andréia Laura Prates Rodrigues - Coorientadora (Universidade FUMEC), aprovada; Dr. Alfeu Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina), aprovada; Dra. Cláudia do Ó Pessoa (Universidade Federal do Ceará), aprovada; Dra. Míriam Chaves Schultz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Erich Birelli Tahara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

(X) APROVADA
( ) REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de dezembro de 2021.

Dra. Andréia Laura Prates Rodrigues - Coorientadora (Universidade FUMEC)

Dr. Alfeu Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Dra. Cláudia do Ó Pessoa (Universidade Federal do Ceará)

Dra. Míriam Chaves Schultz (UFMG)

Documento assinado digitalmente
Alfeu Zanotto Filho
Data: 13/12/2021 22:06:56-0300
CPF: 007.553.509-64
Verifique as assinaturas em https://v.ufsc.br

Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)

Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz pelos ensinamentos, conselhos, parceria e confiança ao longo dessa jornada. O LAMEX é o melhor laboratório do mundo porque você torna isso possível. Obrigada por tudo!

A minha co-orientadora Dra. Andréia Laura Prates Rodrigues pela orientação ao longo dessa jornada, pela amizade e confiança.

À minha família pelo apoio e amor incondicional, por acreditarem em mim e por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês!

Aos colegas do Laboratório de Membranas Excitáveis e de Biologia Cardiovascular (ICB-UFMG), em especial ao Alexandre, Carlos, Gabi, Diego e Artur. Aprendi muito com cada um de vocês e compartilhar essa caminhada com vocês deixou a viagem muito mais divertida.

Aos amigos que fiz no ICB ao longo dessa caminhada, em especial a Priscila, Jéssica, Toniana, Wesley, que estiveram comigo desde o primeiro dia... lá em Bases I. Espero que nossos caminhos continuem se cruzando dentro e fora da ciência.

As queridas amigas Najara, Luiza, Carol e Mari, por todo o apoio, amor e amizade ao longo de tantos anos. Tenho certeza que independentemente de onde estivermos, sempre poderei contar com vocês.

Ao Dr. Alfredo Miranda de Góes, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, por ceder as células de tumores primários que foram utilizadas neste trabalho.

A Dra. Manuela Zaccolo, da Universidade de Oxford, por toda a estrutura e material necessário para a realização dos experimentos de FRET.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG), às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro e técnico que permitiram a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Com grande importância epidemiológica mundial, o câncer de mama é considerado o mais comum e o de maior mortalidade entre as mulheres. Importantes para o controle da concentração intracelular de Ca^{2+} e já utilizados como alvo farmacológico no tratamento de diversas doenças, a expressão de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem foi associada ao desenvolvimento tumoral, com a regulação de processos celulares como proliferação, migração, ciclo celular e apoptose. Nesse sentido, o reposicionamento de alguns medicamentos que bloqueiam a ação desses canais tem sido investigado para um tratamento oncológico mais eficaz, específico e menos efeitos colaterais. Dentre esses, podemos citar o verapamil e a nifedipina, anti-hipertensivos extremamente utillizados na clínica médica mas que apresentam dados controversos quanto aos seus efeitos frente ao desenvolvimento tumoral. Dessa forma, este estudo busca compreender se existe uma relação entre o uso dos bloqueadores de Ca^{2+}, verapamil e nifedipina, e o risco para desenvolver câncer de mama, buscando identificar o possível mecanismo de ação por detrás dessa associação, tendo como foco as vias de sinalização dependentes de Ca^{2+}/AMPc. Nossos resultados demonstram que o uso prolongado dos bloqueadores verapamil e a nifedipina foi capaz de aumentar a proliferação celular, principalmente em células não-tumorais de mama. O uso prolongado desses bloqueadores alterou a concentração intracelular de Ca^{2+}, bem como a expressão de proteínas como NFκB e EPAC. Além disso, a administração de 100 μM de verapamil em células não-tumorais aumentou não somente a concentração intracelular de AMPc, mas também a atividade da enzima PKA, demonstrando que existe uma associação entre as vias de sinalização controladas pelo Ca^{2+} e AMPc no mecanismo de ação ativado por este fármaco. Dessa forma, este estudo demonstrou pela primeira vez que estudos *in vitro* indicam a presença de uma relação entre o uso prolongado de BCC e o aumento da capacidade proliferativa de células mamárias não-tumorais, o que pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. Assim, destacamos que a prescrição desses bloqeuadores para o tratamento de arritmias cardíacas e hipertensão em mulheres com histórico familiar de neoplasias deve ser analisado com cuidado e maiores estudos que buscam desvendar a associação entre as vias de sinalização controladas pelo Ca^{2+} e AMPc devem ser conduzidos.

Palavras-chave: Câncer de mama; Canais iônicos; Ca^{2+} intracelular; AMP cíclico.

ABSTRACT

With great epidemiological importance worldwide, breast cancer is considered the most common and the one with the highest mortality among women. Important for control of intracellular Ca^{2+} concentration and already used as a pharmacological target in treatment of several diseases, voltage-gated Ca^{2+} channels expression has been associated with tumor development and regulation of several cellular processes, such as proliferation, migration, cell cycle and apoptosis. In this sense, repositioning of some drugs that block these channels has been investigated for a more effective, specific cancer treatment and with fewer side effects. Among these, we can mention verapamil and nifedipine, antihypertensive drugs extremely used in clinical medicine, but has controversial data regarding their effects on tumor development. Thus, this study seeks to understand whether there is a relationship between the use of Ca^{2+} blockers, verapamil and nifedipine, and the risk of developing breast cancer, seeking to identify the mechanism of action behind this association, focusing on Ca2+/cAMP-dependent signaling pathways. Our results demonstrate that prolonged use of verapamil and nifedipine was able to increase cell proliferation, mainly in non-tumor breast cells. The prolonged use of these blockers altered Ca^{2+} intracellular concentration, as well as the expression of proteins such as NFκB and EPAC. Furthermore, 100 μM verapamil administration in non-tumor cells increased not only the cAMP intracellular concentration, but also the PKA activity, demonstrating that there is an association between the signaling pathways controlled by Ca^{2+} and cAMP in the mechanism of action activated by this drug. Thus, this study demonstrated for the first time that *in vitro* studies indicate the presence of a relationship between prolonged use of CCB and the increased proliferative capacity of non-tumor breast cells, which may be a risk factor for breast cancer development. Not only, we emphasize that BCC prescription for cardiac arrhythmias and hypertension treatment in women with a family history of neoplasms should be carefully analyzed and further studies that seek to unravel the association between Ca^{2+} and cAMP signaling pathways as a mechanism of action should be conducted.

Key words: Breast cancer; Ion channels; Intracellular Ca^{2+}; Cyclic AMP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenvolvimento tumoral _____ 17

Figura 2 – *Hallmarks* do câncer _____ 18

Figura 3 – Estatísticas para o câncer de mama _____ 19

Figura 4 – Modelo de progressão para alterações proliferativas da mama _____ 20

Figura 5 – Representação tridimensional dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem ____ 23

Figura 6 – Organização espacial da liberação de Ca^{2+} no espaço intracelular _____ 28

Figura 7 – Sinalização intracelular de Ca^{2+} _____ 30

Figura 8 – Bloqueadores de canais de Ca^{2+} _____ 33

Figura 9 – Cultivo celular _____ 41

Figura 10 – Protocolos para eletrofisiologia _____ 44

Figura 11 – Representação esquemática do sensor Epac1_camps _____ 47

Figura 12 - Efeitos dos BCC na proliferação de células não-tumorais MCF-10A _____ 51

Figura 13 – Efeitos dos BCC na proliferação de células não-tumorais MCF-10A _____ 52

Figura 14 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MACL-1 _____ 53

Figura 15 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MACL-1 _____ 54

Figura 16 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MGSO-3 _____ 55

Figura 17 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MGSO-3 _____ 56

Figura 18 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MDA-MB-231 _____ 57

Figura 19 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MDA-MB-231 _____ 58

Figura 20 – Eletrofisiologia celular _____ 59

Figura 21 – $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais e não-tumorais _____ 60

Figura 22 – Efeito prolongado dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células não-tumorais MCF-10A _____ 61

Figura 23 – Efeito prolongado dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MACL-1 _____ 62

Figura 24 – Efeito prolongado dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MGSO-3 _____ 63

Figura 25 – Efeito prolongado dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MDA-MB-231 _____ 64

Figura 26 – Efeito agudo dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células não-tumorais MCF-10A _____ 66

Figura 27 – Efeito agudo dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MACL-1 _____ 67

Figura 28 – Efeito agudo dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MGSO-3_____ 69

Figura 29 – Efeito agudo dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MDA-MB-231_____ 70

Figura 30 – Expressão de canais iônicos permeáveis ao Ca^{2+} _____ 71

Figura 31 – Expressão de kinases reguladas pela concentração de Ca^{2+} _____ 73

Figura 32 – Expressão de fatores de transcrição e EPAC _____ 74

Figura 33 – Efeito do verapamil na concentração intracelular de AMPc _____ 75

Figura 34 – Efeito do verapamil na atividade da PKA _____ 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem _____ 25

Tabela 2 – Lista de anticorpos primários utilizados para o *western-blot* _____ 47

Tabela 3 – Resumo geral dos resultados _____ 80

LISTA DE ABREVIATURAS

$[Ca^{2+}]_{IC}$	Concentração intracelular de Ca^{2+}
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	Adenosina trifosfato
BCC	Bloqueadores de canais de Ca^{2+}
CAMKII	Calmodulina kinase do tipo II
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPAC	*Exchange protein activated by cAMP*
EPM	Erro padrão da média
ERK	*Extracellular signal-regulated kinase*
FRET	Transferência ressonante de energia por fluorescência
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HPV	Papilomavírus humano
HSP90	Heat protein shock
MAP	Proteína kinase ativada por mitógenos
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NCX	Trocador Na^{+}/Ca^{2+}
NFAT	*Nuclear factor of activated T-cells*
NFκB	*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
ORAI	Canal de Ca^{2+} operado por estoques do tipo ORAI
PBS	*Phosphate-buffered saline*
PKA	Proteína kinase A
PKC	Proteína kinase C

PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RIPA	*Radio-Immunoprecipitation Buffer*
RNA	Ácido ribonucleico
RyR	Receptor de rianodina
SDS/PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamina com dodecil-sulfato de sódio
SERCA	Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático
STIM	*Stromal interaction molecule*
TBS	*Tris-buffered saline*
TRP	Canal receptor de potencial transitório (*transient receptor potential)*
TRPC	Canal TRP do tipo canônico
TRPM	Canal TRP do tipo melastatina
TRPV	Canal TRP do tipo vanilóide
VGCC	Canal de Ca^{2+} dependente de voltagem (*voltage-gated* Ca^{2+} *channel*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

1.1.Etiologia e fisiopatologia do câncer 16

1.2.Câncer de mama 19

1.3.Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem 22

1.4.Ca^{2+} como um mensageiro intracelular 25

1.5.Câncer de Mama, bloqueadores de VGCC e a comunicação cruzada entre Ca^{2+} e AMPc 30

2. JUSTIFICATIVA 35

3. OBJETIVOS 37

3.1.Objetivo Geral 38

3.2.Objetivos Específicos 38

4. MATERIAIS E MÉTODOS 39

4.1.Cultivo Celular 40

4.2.Proliferação Celular – Ensaio de MTT 41

4.3.Proliferação Celular – Viabilidade Celular 42

4.4.Eletrofisiologia Celular 42

4.5.Avaliação da Concentração Intracelular de Ca^{2+} 44

4.6.FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 45

4.7.Western-Blot 46

4.8.Análise Estatística 48

5. RESULTADOS 49

5.1.O uso prolongado de verapamil e nifedipina promoveu alterações na capacidade de proliferação celular para as linhagens MCF-10A, MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 50

5.2. As linhagens MCF-10A, MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 não apresentam correntes de Ca^{2+} produzidas pela abertura de VGCC do tipo L ou T 59
5.3. O uso prolongado de verapamil e nifedipina induz alterações na concentração intracelular de Ca^{2+} para as células tumorais e não-tumorais 60
5.4. As alterações na concentração intracelular de Ca^{2+}, em resposta ao verapamil e a nifedipina, são diferentes a depender do tempo de exposição ao fármaco 65
5.5. A exposição prolongada aos fármacos nifedipina e verapamil foi capaz de alterar diferentes vias de sinalização em células não-tumorais e tumorais 71
5.6. Em resposta a administração de 100 μM de verapamil, células MCF-10A e MDA-MB-231 apresentam um aumento na concentração intracelular de AMPc 75
6. DISCUSSÃO 77
7. CONCLUSÕES 84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia e fisiopatologia do câncer

Com grande importância epidemiológica mundial e contabilizando aproximadamente 10 milhões de mortes em 2020, as neoplasias (também conhecidas como tumor ou câncer) já são consideradas a maior causa de morte em todo o mundo (Ferlay 2020, World Health Organization 2021). Este grupo de doenças é caracterizado pela presença de uma massa tecidual amorfa, onde as células apresentam uma alta taxa de proliferação, de maneira desordenada e sem controle. A transformação de células saudáveis em células neoplásicas pode ser deflagrada pelo acúmulo de pequenas mutações no DNA, culminando na desregulação de diferentes processos celulares, como a proliferação e apoptose (Wilson and Waugh 2006, Hanahan and Weinberg 2011, Stewart and Wild 2014).

Células saudáveis apresentam uma extensa rede de sinalizadores responsáveis pelo o controle dos mais diversos processos celulares, como metabolismo, motilidade, crescimento, proliferação e morte celular, a fim de garantir a manutenção de sua função e da arquitetura tecidual (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011). Dentre os sinalizadores, podemos citar alguns genes que atuam no crescimento celular, como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (responsáveis por estimular e inibir o crescimento celular, respectivamente), no reparo do DNA e na regulação da apoptose. Considerados como os principais alvos de um dano genético não-letal, a exposição aos fatores carcinogênicos ao longo da vida (como o tabaco, álcool, radiação ultravioleta e alguns agentes infecciosos) leva a um acúmulo de mutações nesses genes e, consequentemente, a transformação de células saudáveis em células neoplásicas (**Figura 1**) (Vogelstein and Kinzler 2004, Stratton, Campbell et al. 2009).

A associação entre fatores ambientais ou genéticos e o desenvolvimento de algumas neoplasias tem sido observada em diferentes estudos epidemiológicos. É visto que interações entre estes fatores e o DNA resultam em pequenas alterações na informação codificada, resultando em falhas ou até mesmo na perda de algumas funções celulares (Stewart and Wild 2014). Dentre estes fatores podemos citar o histórico familiar, onde tais alterações são herdadas de nossos antepassados. Um exemplo muito bem descrito é a relação entre mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e o desenvolvimento do câncer de mama, que mostrou aumentar em 10 vezes o risco de desenvolvimento dessa neoplasia em mulheres (Marchant 1982, Mavaddat, Peock et al. 2013).

Já os fatores ambientais são associados ao estilo de vida, divididos em agentes biológicos, químicos e físicos. Vários agentes infecciosos já foram associados como fatores de

risco, como o *Helicobacter pylori*, papilomavírus humano (HPV) e os vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV) (Plummer, de Martel et al. 2016). Não somente, o consumo de álcool, o tabagismo, o sedentarismo, contato com poluentes ambientais e a exposição a radiações ionizantes, todos são considerados importantes fatores de risco para uma variedade de neoplasias (Jemal, Vineis et al. 2014).

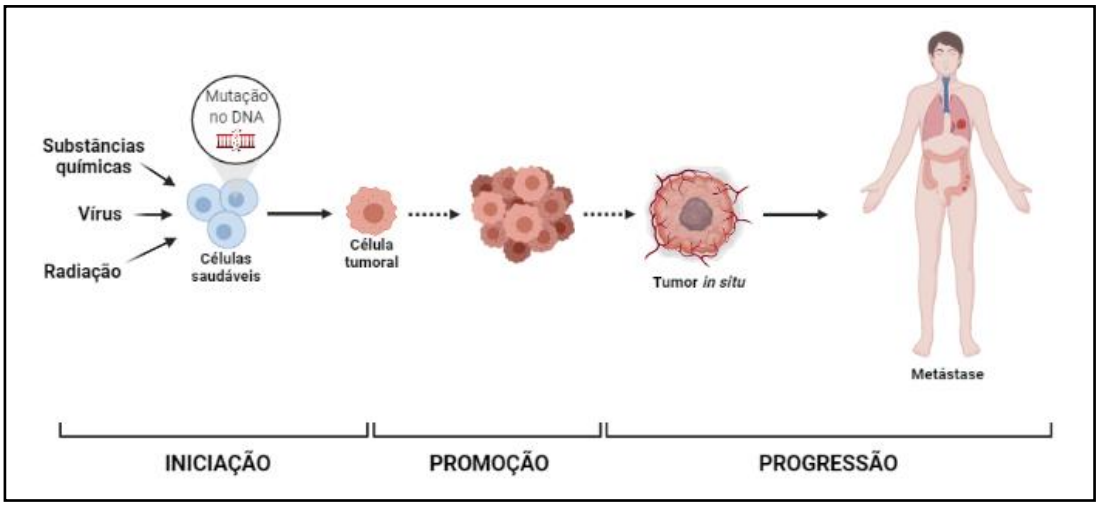

Figura 1 – Desenvolvimento tumoral. A formação do tumor se inicia na exposição das células a diferentes fatores carcinogênicos ao longo da vida, culminando na transformação da mesma. Após transformadas, as células se proliferaram de forma exacerbada, levando a formação de uma massa tumoral localizada. Entretanto, em alguns casos, essas células podem desenvolver características mais agressivas e se instalar em outros órgãos, processo conhecido com metástase (Chambers, Groom et al. 2002, Vogelstein and Kinzler 2004). Imagem criada com BioRender.com.

Uma vez transformada, a célula neoplásica (ou tumoral) passa por uma expansão clonal, onde observamos um aumento exacerbado na sua capacidade proliferativa que tem como resultado a formação de uma massa tumoral. Divididos em benignos e malignos, os tumores podem surgir nos mais diversos tipos teciduais e são classificados de acordo com suas características morfológicas e moleculares. Com uma massa celular bem delimitada e células bem diferenciadas, a neoplasia benigna se assemelha ao tecido de origem. Em contrapartida, as neoplasias malignas possuem células pouco diferenciadas e com maior atipia, onde a massa tumoral se mostra mais infiltrada ao tecido adjacente e a estrutura tecidual não é mantida. Além disso, a presença de metástases (formação de novas lesões tumorais em outros órgãos) é frequentemente observada (Chambers, Groom et al. 2002, Makki 2015, Tsang and Tse 2020).

Com uma grande capacidade de se adaptar a condições adversas, as células tumorais são capazes de alterar todo o seu funcionamento a fim de garantir não apenas a sua sobrevivência,

mas também a manutenção da sua capacidade proliferativa. Assim, a capacidade dessas células em manter os sinais proliferativos sustentados, escapar do sistema imune e de estímulos pró-apoptóticos, ativar vias que permitem a migração e invasão, além de estimular a angiogênese, são características que diferem as células tumorais e também permitem o desenvolvimento e a progressão tumoral (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011, Giancotti 2014) (**Figura 2**).

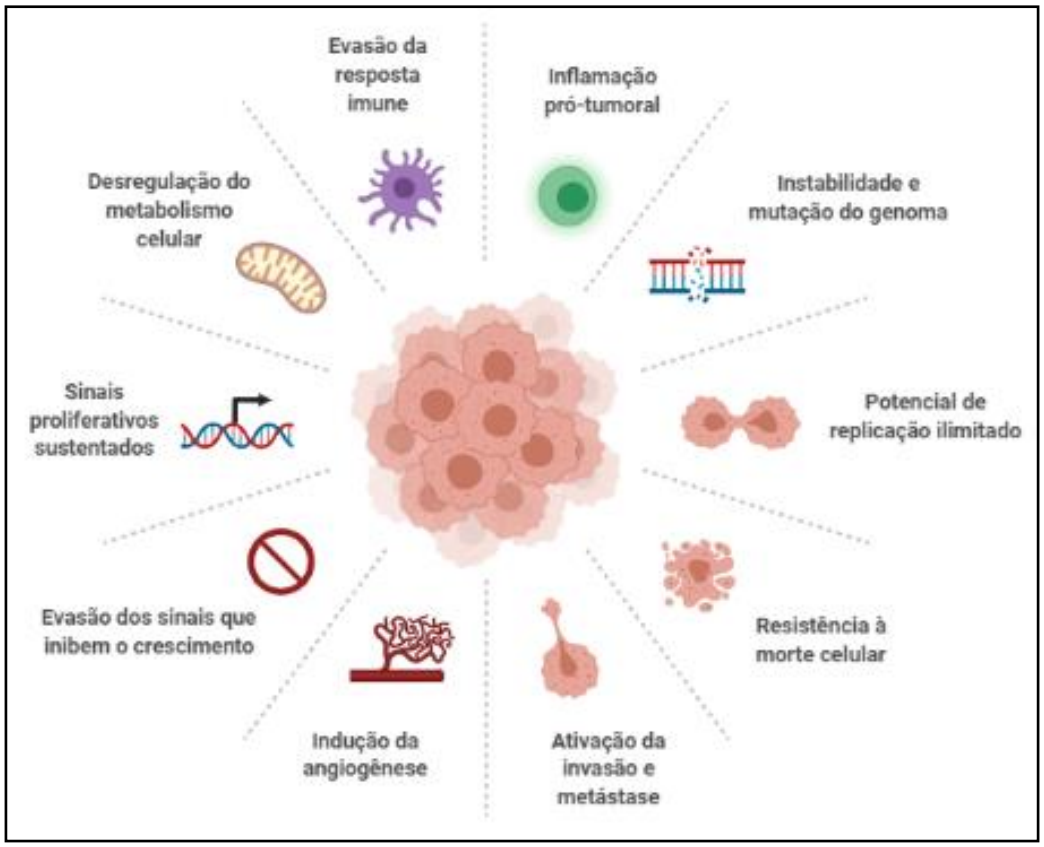

Figura 2 – *Hallmarks* do câncer. Representação das principais características adquiridas pelas células tumorais durante as etapas da tumorigênese**.** Imagem criada com BioRender.com.

Dentro dessa progressão, algumas células passam a apresentar um fenótipo mais agressivo, com a diminuição da adesão celular, aumento da capacidade de migração e degradação da matriz extracelular, permitindo a movimentação destas em direção aos tecidos adjacentes e, em alguns casos, adentrar a circulação sanguínea e/ou linfática. Apesar da baixa probabilidade de sobreviverem ao ambiente vascular, algumas células conseguem se estabelecer em outros tecidos e formar novos tumores. Esse processo, chamado de metástase, é considerado hoje a principal causa de mortalidade entre os pacientes oncológicos (Chambers, Groom et al. 2002, Guan 2015).

1.2 Câncer de mama

Dentre os diversos tipos de neoplasias, o câncer de mama é considerado o mais comum e o de maior mortalidade entre as mulheres, contabilizando 2.3 milhões de novos diagnósticos e 685 mil mortes em todo o mundo, em 2020 (**Figura 3**) (Bray, Ferlay et al. 2018, World Health Organization 2021). Apenas no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, estima-se que em 2020 foram diagnosticados 66.280 mil novos casos da doença e mais de 17 mil óbitos foram registrados (INCA 2020). Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia, a utilização de contraceptivos e reposição hormonal, fatores reprodutivos (esterilidade, amamentação, menarca precoce), histórico familiar e a progressão da idade podem ser destacados. Além disso, o seu alto índice de mortalidade tem sido associado, principalmente, ao diagnóstico tardio e ao aparecimento de metástases (Majeed, Aslam et al. 2014, Stewart and Wild 2014, Winters, Martin et al. 2017).

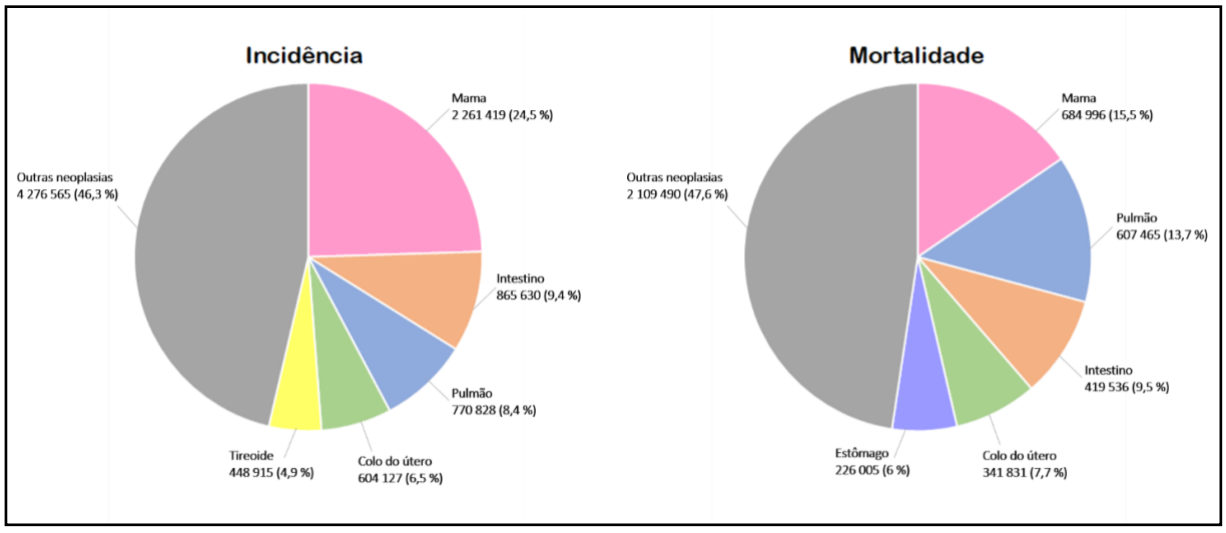

Figura 3 – Estatísticas para o câncer de mama. Números estimados de incidência e mortalidade para os principais tipos de neoplasias em mulheres no mundo, para o ano de 2020 (World Health Organization 2020).

Presentes apenas entre os mamíferos, as glândulas mamárias possuem como principal função a produção, secreção e liberação do leite materno. O processo de desenvolvimento dessa glândula tem início no desenvolvimento embrionário e continua durante a vida, com mudanças mais intensas na fase da puberdade (onde a mama sofre ação do ciclo hormonal feminino), atingindo a maturidade funcional após a gravidez/lactação. Localizada a frente da parede torácica superior, a mama é composta por um tecido glandular e por um estroma especializado. O primeiro é dividido em lóbulos e ductos, formados por células mioepiteliais (responsáveis

pelo fluxo do leite em direção ao ambiente externo) e por células epiteliais luminais (que além de revestir as células mioepiteliais, realizam a produção do leite materno). Já o estroma apresenta basicamente tecidos conjuntivo fibroso e adiposo, com exceção às regiões ao redor dos lóbulos, composta por células que se parecem com fibroblastos e que são capazes de responder aos estímulos hormonais (Pandya and Moore 2011, Hassiotou and Geddes 2013, Alex, Bhandary et al. 2020).

Seguindo um modelo semelhante ao proposto por Vogelstein (Vogelstein, Fearon et al. 1988), o desenvolvimento do carcinoma invasor da mama pode ser descrito como um modelo de etapas, onde há uma progressão entre as alterações que podem acometer a mama (Going 2003, Simpson, Reis-Filho et al. 2005, Lopez-Garcia, Geyer et al. 2010). Entre os distúrbios proliferativos benignos, as hiperplasias ductais são o primeiro degrau dessa progressão e ganham um destaque especial pelo risco aumentado de evoluir para o carcinoma invasor da mama (Hartmann, Radisky et al. 2014, Menes, Kerlikowske et al. 2017, Collins 2018, Figueroa, Gierach et al. 2021). Seguindo esse conceito, as hiperplasias ductais usuais (ou sem atipia) podem se transformar em hiperplasias ductais atípicas, estas em carcinoma ductal *in situ* e, finalmente, em carcinoma ductal invasor (**Figura 4**). Apesar desse modelo ser bastante utilizado por diferentes estudos, já se sabe que esse padrão de progressão não é simples e direto como proposto (Going 2003, Simpson, Reis-Filho et al. 2005, Lopez-Garcia, Geyer et al. 2010).

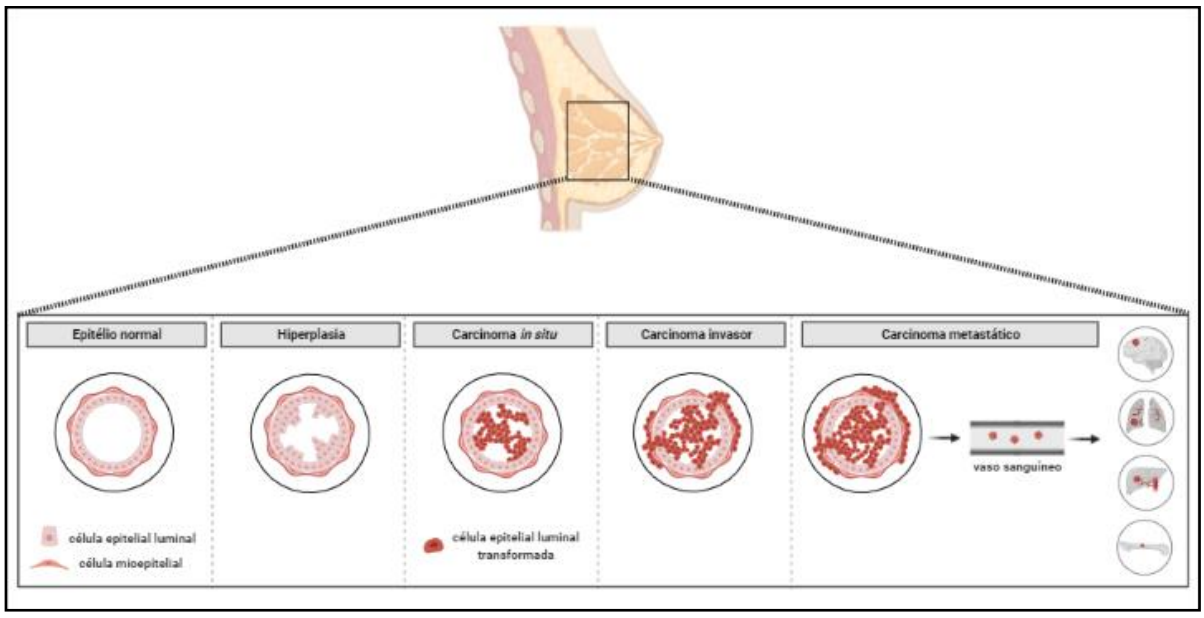

Figura 4 – Modelo de progressão para alterações proliferativas da mama. Alterações proliferativas podem progredir para quadros de carcinomas mamários com diferentes níveis de invasão. Imagem criada com BioRender.com.

A identificação precoce dessas alterações proliferativas é considerada um fator importante, principalmente para a redução na mortalidade dos casos diagnosticados como carcinoma mamário. Apesar do surgimento e utilização de outras metodologias diagnósticas, a mamografia ainda é considerada o principal método diagnóstico para os tumores localizados na mama (Giess, Frost et al. 2012, Stewart and Wild 2014, World Health Organization 2021). Não somente, a realização de exames histopatológicos que buscam avaliar as características moleculares apresentadas por cada tumor (como o presença de receptores para estrógeno e progesterona, para o fator de crescimento epidémico, e outros marcadores) é de grande importância para a definição do tratamento e do prognóstico (Rakha, Reis-Filho et al. 2010, Allison 2012, Dai, Xiang et al. 2016, Tsang and Tse 2020).

A mastectomia (parcial ou total), a quimioterapia e a radioterapia são as terapias mais adotadas no tratamento dos tumores mamários, podendo ser utilizados de forma isolada ou associado à outros protocolos (Majeed, Aslam et al. 2014, Stewart and Wild 2014, World Health Organization 2021). Nos últimos anos, a imunoterapia, os anticorpos monoclonais, produtos naturais, e até mesmo a realização de exercício físico durante o tratamento, é cada vez mais utilizada pela clínica médica no tratamento do paciente oncológico (Majeed, Aslam et al. 2014, Emens 2018, Turner, Steed et al. 2018).

Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia da doença, a busca por novas moléculas que atuem como biomarcadores se faz necessária, representando uma alternativa para problemas como a resistência aos quimioterápicos desenvolvida por alguns pacientes, os diversos efeitos colaterais causados pelo tratamento oncológico, bem como a necessidade de métodos diagnósticos mais eficazes e precoces (Arcangeli and Becchetti 2015, Jafari, Saadatpour et al. 2018, Mintz, Gao et al. 2018, Waterhouse, Ugur et al. 2019, Day, Hickey et al. 2020, Peng, Jiang et al. 2020). Importantes para o controle da permeabilidade celular aos diferentes íons e já utilizados como alvo farmacológico no tratamento de diversas doenças, os canais iônicos vêm ganhando grande destaque na busca de novos diagnósticos e tratamentos para o câncer (Arcangeli and Becchetti 2015, Azimi and Monteith 2016, Phan, Wang et al. 2017, Prevarskaya, Skryma et al. 2018).

Quase 70 anos após a publicação do trabalho seminal de Hodgkin e Huxley, que identificou a presença de canais iônicos dependentes de voltagem no axônio gigante de lula e o seu papel na bioeletrogênese (Hodgkin and Huxley 1952), a presença destas proteínas transmembrana também foi descrita em diferentes células não-excitáveis, como células-tronco

(Tan, Fei et al. 2019), hemácias (Kaestner, Wang et al. 2018), linfócitos T (Davenport, Li et al. 2015) e em células tumorais (Lee, Park et al. 2015, Chow, Cheng et al. 2018, Prevarskaya, Skryma et al. 2018), com atuação em diversas funções celulares (Davenport, Li et al. 2015, Morera, Saravia et al. 2015, Patel and Brackenbury 2015, Phan, Wang et al. 2017, Seitter and Koschak 2018, Johansson, Karema-Jokinen et al. 2019). Dentre os membros dessa grande e diversificada família, um destaque é dado aos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (*voltage-gated calcium channels* - VGCC).

1.3 Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem

Considerados um dos principais reguladores da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{IC}$), os VGCC participam de diferentes vias de sinalização celular, podendo atuar sozinhos ou interagir com inúmeras proteínas, como GTPases, calmodulina e outros canais iônicos e trocadores (proteínas que, assim como os canais iônicos, controlam a passagem de íons através da membrana, mas que o fazem sob o acoplamento da energia gerada pela dissipação do gradiente eletroquímico dos íons), contribuindo para vários processos celulares, desde a regulação da secreção de hormônios e neurotransmissores, controle e manutenção da resistência vascular, da função de marca-passo cardíaco, até mecanismos que atuam na aquisição e processamento de memória e comportamento (Catterall 2011, Zamponi, Striessnig et al. 2015, Dolphin 2016, Dolphin 2018).

Estruturalmente, esses canais se apresentam como um complexo proteico, proveniente da associação de quatro ou cinco subunidades distintas, e foram classificados, até o presente momento, em 5 subclasses de acordo com suas propriedades biofísicas e farmacológicas: canais do tipo L (*long-lasting current*), N (*neuronal type*), P/Q (*Purkinje neurons type*), R (*resistent current*) e T (*transient and/or tiny current*). Cinco subunidades podem se organizar na membrana celular, como apresentado pela **Figura 5**, para a formação desse complexo e, consequentemente, para o funcionamento adequado destes canais. O centro desse complexo é ocupado pela subunidade $Ca_v\alpha1$, uma proteína de aproximadamente 190 kDa, responsável pela formação do poro transmembrana (Catterall, Striessnig et al. 2003, Dolphin 2018, Catterall, Lenaeus et al. 2020).

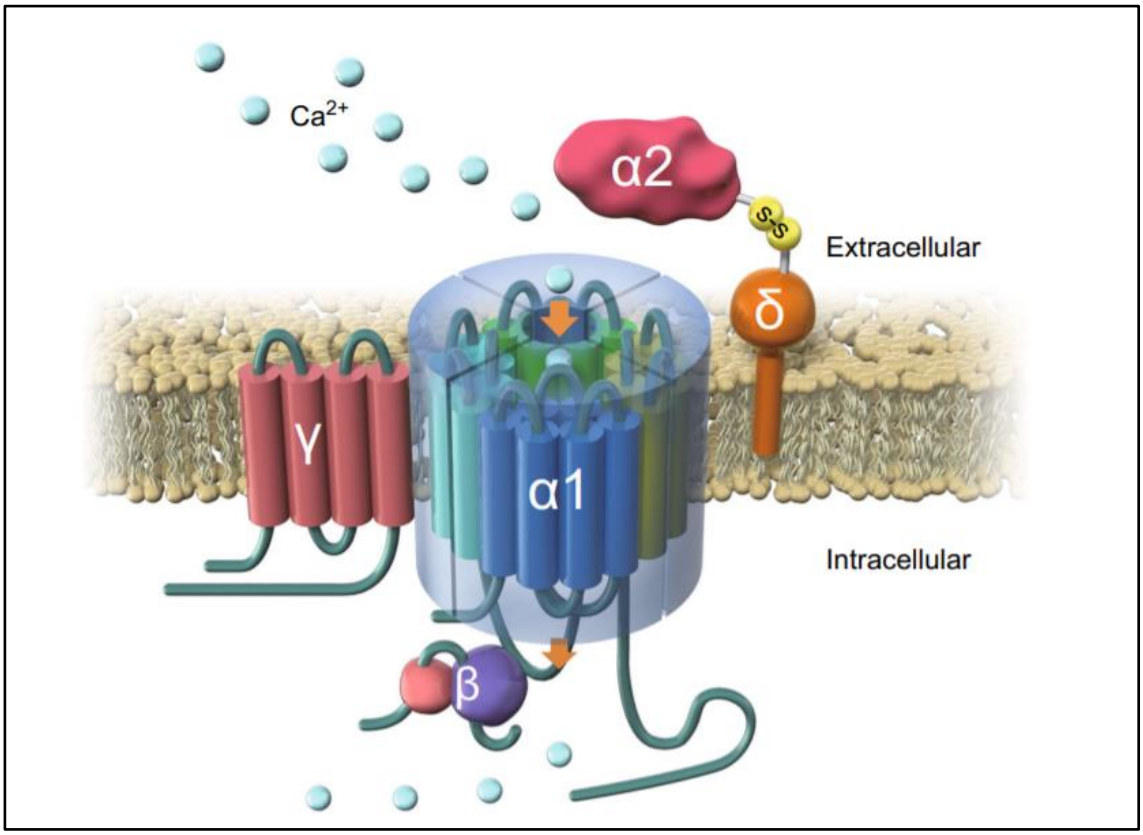

Figura 5 – Representação tridimensional dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Na figura, podemos visualizar a subunidade formadora do poro transmembrana $Ca_v\alpha1$, com seus 4 domínios homólogos (representados nas cores azul, amarelo, verde e anil) e cada um com seus 6 segmentos transmembrana. Em laranja, temos a subunidade $Ca_v\delta$ ancorada a membrana citoplasmática e ligada a subunidade extracelular $Ca_v\alpha2$ (em vermelho) por pontes dissulfeto. Na membrana, também temos a presença da subunidade $Ca_v\gamma$ (representada em marrom), enquanto no espaço intracelular, temos a presença da subunidade $Ca_v\beta$ (em roxo) ligada à alça de ligação entre os domínios I e II da subunidade $Ca_v\alpha1$ (Ninomiya, Mizobuchi et al. 2020).

A subunidade conta com a presença de 24 segmentos transmembrana, divididos em quatro domínios homólogos (DI – DIV). Estes segmentos se apresentam sob a forma de α hélices e vão apresentar um importante papel na dependência de voltagem apresentada por estes canais. Cada segmento S4, em associação aos segmentos S1-S3, funciona como um sensor de voltagem, enquanto S5-S6, além de formar o poro, participam da seletividade do canal aos íons Ca^{2+}. Em resposta a despolarização da membrana, resíduos de arginina (carregados positivamente em pH fisiológico) presentes em cada segmento transmembrana S4, pertencente a cada um dos domínios – DI a DIV – movimentam-se no campo elétrico gerado no interior da membrana celular, induzindo alterações conformacionais, que culminam na abertura do poro transmembrana. Seguindo o gradiente eletroquímico, um influxo de Ca^{2+} é observado e a seletividade apresentada pelo canal é associada a presença de quatro resíduos de glutamato

(carregados negativamente) que, ao interagir com os íons Ca^{2+}, formam o filtro de seletividade. Até o momento foram identificados cerca de 10 isoformas de $Ca_v\alpha1$ (codificadas pelos genes CACNA1A – CACNA1I e CACNA1S), que podem ainda apresentar *splicing* alternativos que aumentam, portanto, a diversidade molecular apresentada pelos VGCC (Catterall 2011, Dolphin 2016, Catterall, Lenaeus et al. 2020, Pitt, Matsui et al. 2021).

Apesar de apenas a subunidade $Ca_v\alpha1$ ser necessária para a formação do poro que permite a passagens dos íons Ca^{2+} através da membrana celular, a associação com outras subunidades regulatórias é comumente relatada pela literatura para todos os subtipos, exceto para canais de Ca^{2+} do tipo T (**Tabela 1**), sendo de grande importância para regulação da expressão, transporte e endereçamento do mesmo à membrana plasmática, bem como para a modulação de algumas de suas propriedades biofísicas intrínsecas. Apresentando-se como um dímero extracelular, as subunidades $Ca_v\alpha2$ e $Ca_v\delta$ se ligam por pontes dissulfeto e evidências apontam que estas se associam à $Ca_v\alpha1$ por diferentes sítios de ligação localizados nas alças extracelulares dos domínios I a III. Já a subunidade $Ca_v\beta$ se liga à $Ca_v\alpha1$ através de um único sítio de ligação intracelular, na alça de ligação entre os domínios I e II. Enquanto estas quatro subunidades são expressas em quase todas as isoformas dos VGCC, a subunidade $Ca_v\gamma$ é mais presente em canais do tipo L expressos no músculo esquelético (Catterall 2011, Dolphin 2016, Dolphin 2018, Catterall, Lenaeus et al. 2020).

VGCC	Gene	Subunidades associadas	Expressão	Funções celulares
L-type				
Ca_v 1.1	CACNA1S	α2-δ, β, γ	Músculo esquelético.	Acoplamento excitação-contração, regulação da transcrição de proteínas
Ca_v 1.2	CACNA1C	α2-δ, β, γ	Músculos cardíaco e liso, células endócrinas, SN.	Acoplamento excitação-contração, regulação da transcrição de proteínas e da atividade enzimática, secreção endócrina, formação do transiente de Ca^{2+} em neurônios.
Ca_v 1.3	CACNA1D	α2-δ, β, γ	Células endócrinas, SN, células do aparelho auditivo.	Secreção endócrina, marcapasso cardíaco, formação do transiente de Ca^{2+} em neurônios, transdução auditiva.
Ca_v 1.4	CACNA1F	α2-δ, β, γ	Retina.	Transdução visual.
P/Q-type				
Ca_v 2.1	CACNA1A	α2-δ, β, γ*	SN.	Liberação de neurotransmissores, formação do transiente de Ca^{2+} em neurônios.
N-type				
Ca_v 2.2	CACNA1B	α2-δ, β1, β3, β4, γ*	SN.	Liberação de neurotransmissores, formação do transiente de Ca^{2+} em neurônios.
R-type				
Ca_v 2.3	CACNA1E	α2-δ, β, γ*	SN.	Potencial de ação repetitivo, liberação de neurotransmissores, formação do transiente de Ca^{2+} em neurônios.
T-type				
Ca_v 3.1	CACNA1G	-	Músculo cardíaco, SN.	Marcapasso cardíaco, potencial de ação repetitivo.
Ca_v 3.2	CACNA1H	-	Músculo cardíaco, SN.	Marcapasso cardíaco, potencial de ação repetitivo.
Ca_v 3.3	CACNA1I	-	SN.	Marcapasso cardíaco, potencial de ação repetitivo.

Tabela 1 – Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. VGCC, Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. SN, Sistema nervoso. *, associação à subunidade γ não é comum para estes canais, mas pode ocorrer. Fonte: (Catterall, Striessnig et al. 2003, Catterall 2011, Zamponi, Striessnig et al. 2015, Dolphin 2016).

Com um importante papel na excitabilidade celular, a abertura e o fechamento dos canais dependentes de voltagem fazem parte de um ciclo simples, que consiste basicamente no fluxo de íons entre os ambientes extra e intracelular, alterando o potencial de membrana e, consequentemente, levando a abertura e/ou o fechamento de outros canais dependentes de voltagem. Entretanto, a abertura dos VGCC gera um aumento da $[Ca^{2+}]_{IC}$, um importante sinalizador intracelular, de maneira localizada (microdomínios) ou global. Dessa forma, a ativação desses canais traduz a atividade elétrica em importantes mudanças no ambiente intracelular, como a contração das células musculares, a liberação de neurotransmissores ou a secreção de alguns hormônios (Catterall and Swanson 2015, Roux 2017, Dolphin 2018, Catterall, Lenaeus et al. 2020, Pitt, Matsui et al. 2021).

Entretanto, a presença desses canais em células que não possuem a capacidade de gerar um potencial de ação não despertou grande atenção, já que pouco se sabia sobre os mecanismos que permitem que essas células controlem o potencial de membrana. Estudos utilizando linfócitos T e células de osteosarcoma mostraram que alterações na $[Ca^{2+}]_{IC}$ e no potencial de membrana estavam correlacionadas com a ativação de VGCC (Alcover, Weiss et al. 1986, Chesnoy-Marchais and Fritsch 1988, Pitt, Matsui et al. 2021). Os mecanismos por detrás da função destes canais em células não-excitáveis ainda permanecem pouco compreendidos. É possível que o estímulo despolarizante necessário para a ativação destes canais tenha relação com outros canais iônicos presentes na membrana celular, como canais do tipo TRPC (*transient receptor potential canonical*) (Santillán, Baldi et al. 2004, Pitt, Matsui et al. 2021). Ou ainda, que estes canais apresentam funções não-canônicas, como, por exemplo, na regulação da expressão proteica, do ciclo celular, tráfego de moléculas, entre outras (1992, Dolphin 2018, Rosendo-Pineda, Moreno et al. 2020, Pitt, Matsui et al. 2021).

1.4 Ca^{2+} como um mensageiro intracelular

Considerado um importante e potente sinalizador intracelular, os íons Ca^{2+} são capazes de regular várias funções celulares essenciais, desde a transmissão sináptica e até a transcrição gênica, devido a mudanças na $[Ca^{2+}]_{IC}$ por condições fisiológicas e/ou patológicas. Com valores próximos à 1.8 mM e 100 nM nos meios extra- e intracelular, respectivamente, a regulação da homeostase de Ca^{2+} fica a cargo de dois grupos de proteínas: (1) proteínas citoplasmáticas, por vezes encontradas de forma solúvel, que funcionam como "sensores" de Ca^{2+}, apresentando funções de tamponamento e/ou de processamento da informação, ativando

determinadas vias de sinalização intracelular; e (2) proteínas transmembrana, como canais iônicos, trocadores e bombas, necessárias para a manutenção dos níveis de Ca^{2+} no citoplasma ou mesmo entre o citoplasma e o lúmen de organelas, através do transporte (passivo ou ativo) desses íons (Bagur and Hajnóczky 2017, Dewenter, von der Lieth et al. 2017, Samanta and Parekh 2017, Yang, Yue et al. 2020).

É a versatilidade com que as alterações na $[Ca^{2+}]_{IC}$ acontecem que permite que um único sinalizador seja responsável por controlar um extenso repertório de processos celulares. Sabe-se que não somente a variação da concentração, mas também a forma pela qual tais oscilações se apresentam no espaço e no tempo se mostraram de grande importância para a regulação das vias de sinalização que deverão ser ativadas (por exemplo, se ocorrem na forma de transientes ou se são sustentadas, limitadas ou não à microdomínios específicos) (Carafoli and Krebs 2016, Monteith, Prevarskaya et al. 2017, Samanta and Parekh 2017). Um exemplo desse comportamento são os receptores de rianodina (RyR), canais de Ca^{2+} intracelulares presentes na membrana do retículo sarcoplasmático e que apresentam diferentes níveis de estimulação frente as oscilações do Ca^{2+} citoplasmático (**Figura 6**).

Quando o estímulo que chega aos RyR é pequeno, os mesmos são ativados individualmente e, consequentemente, o aumento do Ca^{2+} citoplasmático observado é pequeno e localizado (microdomínios) (**Figura 6B**). Apesar de raros, esses eventos são considerados essenciais para a construção de outras respostas maiores e mais complexas, como a ativação coordenada de vários receptores e que resulta nas chamadas *sparks* de Ca^{2+} (**Figura 6C**). Quando o Ca^{2+} é liberado por esses canais ativados, novos *clusters* são ativados e estimulam uma nova liberação, que vão ativar novos receptores de maneira sucessiva. Esse processo é conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} e é responsável pelas ondas de Ca^{2+}, que podem estar limitadas a uma única célula (**Figura 6D**) ou ser transmitidas para células adjacentes (**Figura 6E**) (Cheng, Lederer et al. 1993, Lipp and Niggli 1996, Berridge 1997, Berridge, Lipp et al. 2000, Laude and Simpson 2009). Esse fenômeno leva a um aumento global na $[Ca^{2+}]_{IC}$, mas também é responsável por coordenar atividades locais, como liberação de vesículas, metabolismo mitocondrial e sinalizações intracelulares (Lipp, Thomas et al. 1997, Berridge, Lipp et al. 2000, Oheim, Kirchhoff et al. 2006, Laude and Simpson 2009).

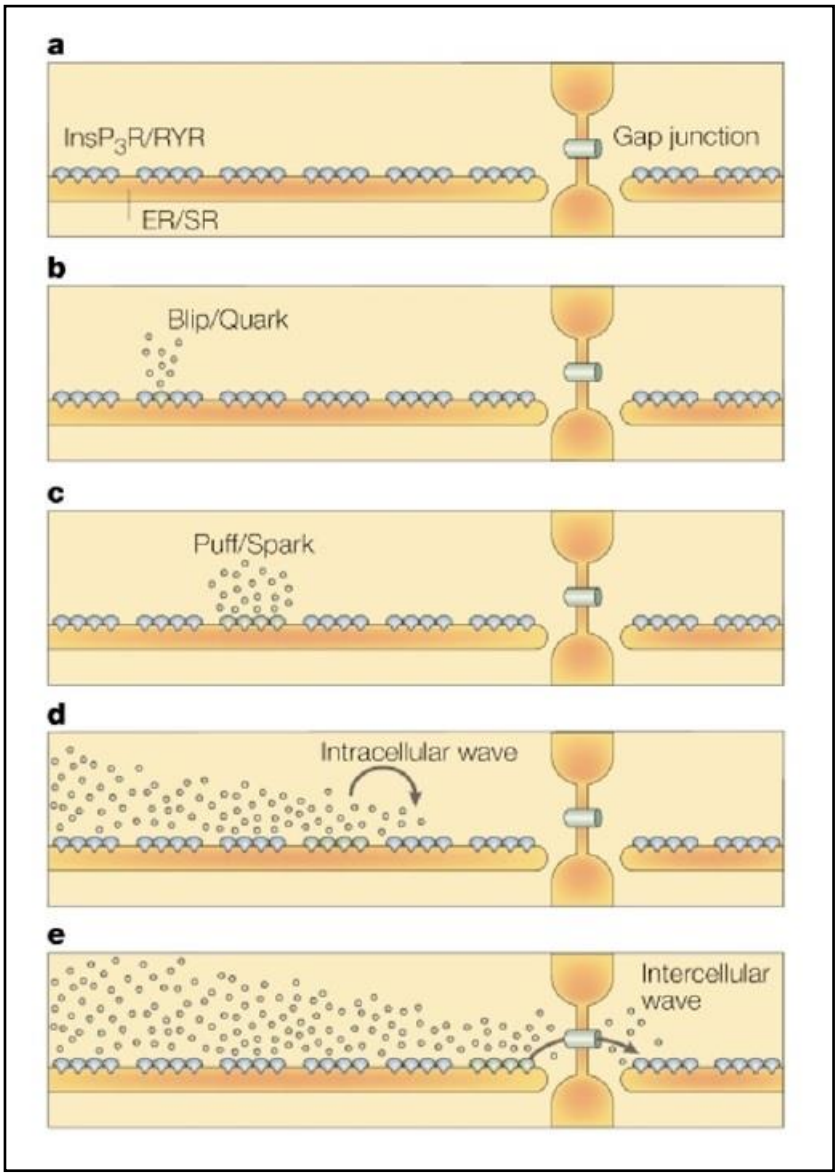

Figura 6 – Organização espacial da liberação de Ca^{2+} no espaço intracelular. Receptores de rianodina (RyR) e de Inositol – 1,4,5-trifosfato ($InsP_3R$) são expressos na membrana do retículo endo/sarcoplasmático (ER/SR) (a). Em resposta a um pequeno estímulo, a ativação desses receptores ocorre de forma individual, com a liberação pontual de Ca^{2+} (*blip* ou *quark*) (b). Já em estímulos maiores, é observada a ativação de *clusters* desses receptores, com a abertura em conjunto dos mesmos e a formação de *puffs* ou *sparks* (c). Em alguns casos, a formação desses *sparks* podem ativar a ativação de Ca^{2+} ativada por Ca^{2+}, com a observação da chamada onda de Ca^{2+} (d), que pode acontecer em uma célula individualmente ou passar para células vizinhas por ação das junções do tipo gap (e). Figura de (Berridge, Lipp et al. 2000).

Além das variações espaciais na $[Ca^{2+}]_{IC}$, o tempo pelo o qual esses estímulos são mantidos também é considerado uma forma de regular as vias de sinalização intracelular. Normalmente, o aumento de Ca^{2+} acontece de forma rápida. Porém, pode ser necessário que o estímulo seja mantido por um período mais prolongado, que pode variar de alguns segundos até

horas. Nesses casos, a manutenção da alta concentração de Ca^{2+} (entre 500 nM e 1μM) é feita através da repetição de estímulos curtos (que podem ser *sparks* ou ondas de Ca^{2+}) e a frequência com que tais repetições ocorrem é o que indica a via de sinalização que deve ser ativada. Para isso, as células contam com a proteína quinase dependente de Ca^{2+}/calmodulina do tipo II (CAMKII) e a proteína quinase C (PKC), duas enzimas responsáveis por decodificar esses sinais de frequência e, consequentemente, ativar as vias de sinalização adequadas para cada estímulo (Oancea and Meyer 1998, Berridge, Lipp et al. 2000, Dupont, Houart et al. 2003).

Não somente, outro fator que colabora para uma atuação diversa da sinalização de Ca^{2+} é sua estreita relação com outro importante segundo mensageiro intracelular: adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Produzido pela conversão de ATP em AMPc e pirofosfato por ação da enzima adenilato ciclase, o AMPc apresenta com uma baixa concentração intracelular em condições basais (cerca de 1 μM) e alterações em sua concentração ocorrem de maneira bastante localizada (Yan, Gao et al. 2016, Koschinski and Zaccolo 2017, Bers, Xiang et al. 2019). Presente em diversas condições patológicas, como doenças neurodegenerativas, depressão, diabetes e até mesmo neoplasias (Hofer 2012, Caricati-Neto, García et al. 2015, Bergantin 2019, Bergantin 2020), variações nos níveis intracelulares de Ca^{2+} são capazes de influenciar tanto na produção quanto nos mecanismos de regulação do AMPc, e vice-versa. Por exemplo, sabe-se que o aumento da atividade dos canais do tipo L em células do músculo cardíaco e esquelético pode ser induzido pelo AMPc (Berridge, Lipp et al. 2000, Hofer 2012, Yan, Gao et al. 2016, Bers, Xiang et al. 2019).

Dessa forma, o aumento da $[Ca^{2+}]_{IC}$ é capaz de estimular diversas respostas e, assim, regular uma vasta gama de processos celulares, como contração muscular, ciclo celular, apoptose, remodelamento do citoesqueleto, migração, secreção, proliferação e ativação do metabolismo energético (como a β-oxidação dos ácidos graxos, por exemplo) (**Figura 7**) (Berridge, Lipp et al. 2000, Carafoli and Krebs 2016, Dewenter, von der Lieth et al. 2017, Monteith, Prevarskaya et al. 2017, Samanta and Parekh 2017, Yang, Yue et al. 2020). Logo, não é difícil imaginar que as vias de sinalização reguladas pelo Ca^{2+} são capazes de regular processos que estão associados ao desenvolvimento e a progressão tumoral (Stewart, Yapa et al. 2015, Monteith, Prevarskaya et al. 2017, Bong and Monteith 2018, Tajada and Villalobos 2020).

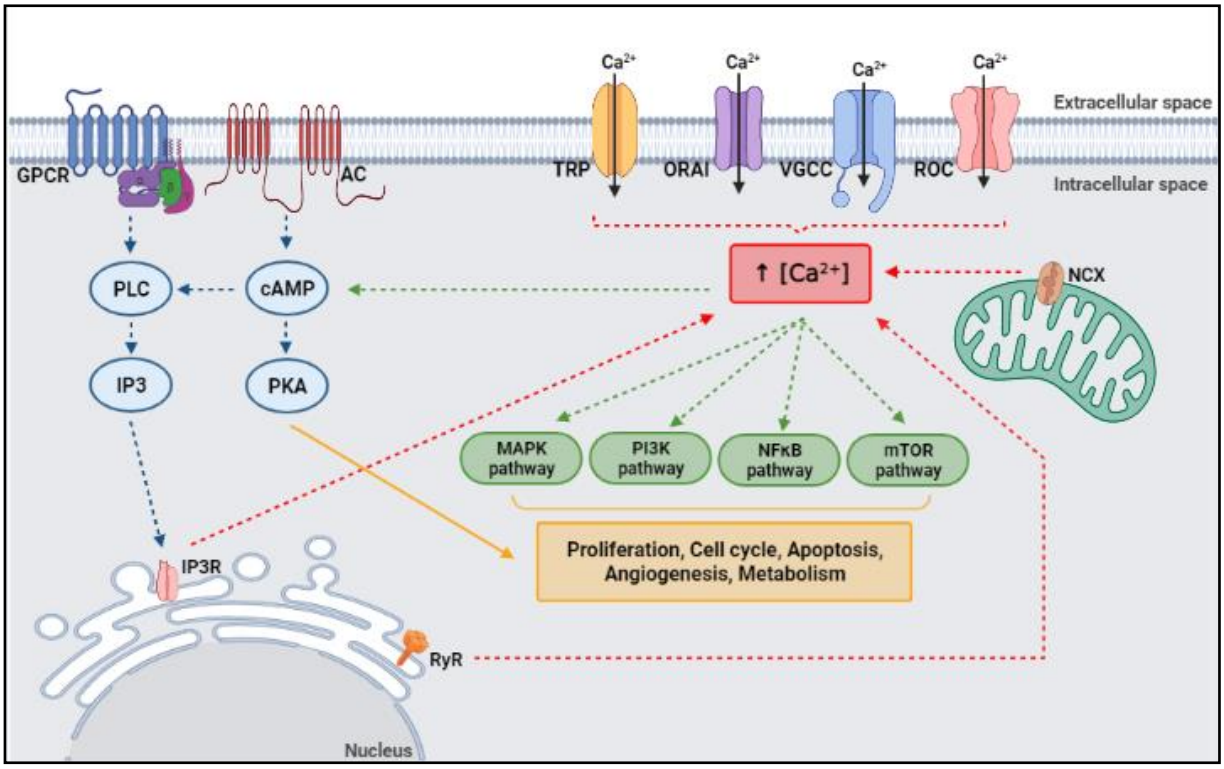

Figura 7 – Sinalização intracelular de Ca^{2+}. A concentração intracelular de Ca^{2+} é aumentada em resposta a ativação de diferentes canais e/ou trocadores localizados na membrana celular ou em organelas citoplasmáticas (setas em vermelho). Devido a sua ampla atuação, o Ca^{2+} pode ativar diferentes vias de sinalização (setas em verde) e, consequentemente, regular diferentes processos celulares importantes para o desenvolvimento e progressão tumoral (setas em amarelo). AC (adenilato ciclase). GPCR (Receptor acoplado à proteína G). IP3R (receptor para inositol 1,4,5-trisfosfato). PKA (proteína kinase A). PLC (fosfolipase C). NCX (trocador Na^{+}/Ca^{2+}). ORAI (*store-operated ORAI channels*). ROC (*receptor-operated channels*). RyR (Receptor para Rianodina). TRP (*transient receptor potential channels*). VGCC (*voltage-gated Ca^{2+} channels).* Imagem criada com BioRender.com.

1.5 Câncer de Mama, bloqueadores de VGCC e a comunicação cruzada entre Ca^{2+} e AMPc

Alterações no padrão de expressão e/ou funcionamento dos canais permeáveis ao Ca^{2+} já foram relacionadas com processos celulares importantes para o desenvolvimento e a progressão de tumores da mama, como proliferação, migração, ciclo celular e apoptose, além de regular vias de supressão tumoral e/ou oncogênicas e o processo de transição epitélio-mesênquima (Azimi and Monteith 2016, Monteith, Prevarskaya et al. 2017, Phan, Wang et al. 2017, Bong and Monteith 2018, Tajbakhsh, Pasdar et al. 2018, Bhargava and Saha 2019, Sharma, Wu et al. 2019, Tajada and Villalobos 2020). Canais da família dos TRPs (*transient receptor potential*) demonstraram uma maior expressão em diversos tipos de carcinomas,

incluindo o de mama, como o TRPC1, TRPC3, TRPC6 TRPV6 e TRPM7. Da mesma forma, canais ORAI1 e ORAI3 (*Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels*) se mostraram superexpressos em vários tipos de neoplasias mamárias. Apesar de pouco entendimento acerca dos mecanismos relacionados a estes canais no ambiente tumoral, já se sabe que os mesmos estão envolvidos em vários *hallmarks* do câncer (Monteith, Prevarskaya et al. 2017, Prevarskaya, Skryma et al. 2018, Tajada and Villalobos 2020).

Os VGCC também foram associados ao desenvolvimento tumoral. Canais $Ca_v1.1$ e $Ca_v1.3$ foram identificados em tumores de mama e sua expressão foi correlacionada com processos importantes para o aumento da agressividade tumoral, como migração, invasão e metástase (Jacquemet, Baghirov et al. 2016, Prevarskaya, Skryma et al. 2018). Metanálises realizadas a partir das informações contidas no Oncomine, uma base de dados pública que apresenta os perfis de expressão de RNA mensageiro obtidos pela análise de diversos tipos de tumores em todo o mundo, revelaram que: 1) a expressão dos canais Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3, Cav3.1 e Cav3.2 encontrava-se reduzida (Phan, Wang et al. 2017); e 2) a expressão dos canais Cav1.2, Cav1.3, Cav2.2, Cav3.1 e Cav3.3 encontrava-se aumentada para o câncer de mama (Wang, Lai et al. 2015), quando comparado com amostras saudáveis da glândula mamária. Entretanto, devido a diversidade dos tumores em relação aos subtipos histopatológicos e/ou clínicos, que podem influenciar no perfil de desenvolvimento e progressão dos tumores, os resultados encontrados podem divergir de outros trabalhos já publicados (Phan, Wang et al. 2017).

Como um possível mecanismo pelo qual as células tumorais desenvolvem algumas de suas características, variações na expressão de canais e transportadores que regulam a entrada do Ca^{2+} no meio intracelular pode explicar como essas células conseguem desenvolver algumas de suas características, como a resistência a morte celular programada (uma vez que aumento global e sustentado do Ca^{2+} intracelular pode ser responsável por ativar vias de sinalização que estimulam a apoptose) (Stewart, Yapa et al. 2015, Monteith, Prevarskaya et al. 2017, Prevarskaya, Skryma et al. 2018). Além do Ca^{2+}, alterações na concentração intracelular de AMPc também foram associadas à processos ligados a agressividade tumoral, como proliferação, migração, apoptose e resistência farmacológica (Son, Lee et al. 2010, Dong, Claffey et al. 2015, Amunjela and Tucker 2017, Mishra, Belder et al. 2018, Jiang, Yan et al. 2019, Tang, Liu et al. 2021).

Nesse sentido, os VGCC e outras proteínas que participam da via de sinalização de Ca^{2+}/AMPc têm sido apontados como possíveis marcadores e/ou alvos farmacológicos para o tratamento e/ou diagnóstico de tumores. Já utilizados pela clínica médica, estudos que buscam o reposicionamento de alguns medicamentos torna a possibilidade de um tratamento oncológico mais eficaz, específico e menos efeitos colaterais uma realidade mais próxima (Wang, Lai et al. 2015, Phan, Wang et al. 2017, Sapio, Gallo et al. 2017, D'Agostino, Saporito et al. 2018, Prevarskaya, Skryma et al. 2018, Bhargava and Saha 2019). Entre estes, podemos citar os bloqueadores de canais de Ca^{2+} (BCC), fármacos que atuam nos VGCC (principalmente, canais do tipo L e/ou T) e que são amplamente utilizados pela clínica no tratamento da hipertensão e arritmias cardíacas (Catterall and Swanson 2015, Laurent 2017, Cuspidi, Tadic et al. 2018, Mills, Stefanescu et al. 2020).

Com uma ação vasodilatadora, contribuindo para a redução da resistência vascular periférica total e da pressão arterial, além do aumento do débito cardíaco, essa classe farmacológica pode ser dividida em dois grandes grupos: as dihidropiridinas (como a nicardipina e a nifedipina, por exemplo) e as não-dihidropiridinas, representados pelo verapamil (fenilalquilamina) e pelo diltiazem (benzodiazepínico) (**Figura 8**) (Catterall and Swanson 2015, Dolphin 2016, Laurent 2017, Prevarskaya, Skryma et al. 2018). Apesar de bem tolerados, são fármacos que apresentam diferentes efeitos colaterais e, em alguns casos, apresentam variadas e importantes interações medicamentosas com outros fármacos ou contra-indicações de uso para tratamento de algumas alterações cardiovasculares (Kiriyama, Honbo et al. 2016, Laurent 2017, Cuspidi, Tadic et al. 2018, Gandini, Palli et al. 2018).

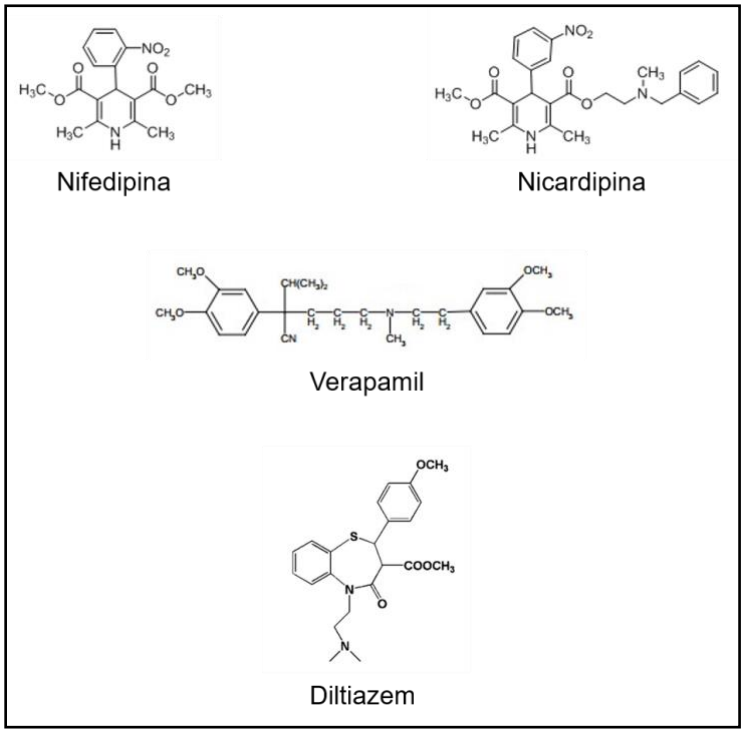

Figura 8 – Bloqueadores de canais de Ca^{2+}. Representação da estrutura química de alguns representantes dessa classe farmacológica: a nifedipina e nicardipina (dihidropiridinas), verapamil (fenilalquilamina) e diltiazem (benzodiazepínico).

Desde a década de 70, a relação entre o uso de anti-hipertensivos, incluindo os BCC, e o câncer é discutida, buscando entender se o uso desses medicamentos poderia contribuir para o desenvolvimento/progressão de tumores (Heinonen, Shapiro et al. 1974, MRC 1992, Kaplan 1996, Tadic, Cuspidi et al. 2019). Apesar do tema ser antigo e recorrente na literatura, ainda não existe um consenso sobre essa relação. Trabalhos que demonstram uma correlação entre BBC e câncer de mama (Pahor, Guralnik et al. 1996, Fitzpatrick, Daling et al. 1997, Li, Malone et al. 2003, Largent, Bernstein et al. 2010, Li, Daling et al. 2013, Leung, Hung et al. 2015, Gómez-Acebo, Dierssen-Sotos et al. 2016) são contrapostos por outros que não apresentam (Grimaldi-Bensouda, Klungel et al. 2016, Chen, Chubak et al. 2017, Ni, Rui et al. 2017, Busby, Murray et al. 2018, Zhao, Wang et al. 2018) ou até mesmo mostram um efeito benéfico no uso desses fármacos (Holmes, Griffith et al. 2013, Shih, Kao et al. 2020).

Apesar da relação entre o risco de desenvolvimento de tumores mamários e o uso de BCC ter ganhado força nos últimos anos, ainda não se sabe por qual mecanismo o bloqueio dos VGCC poderia auxiliar no processo de tumorigênese. Uma das primeiras hipóteses levantadas foi alterações no controle da apoptose, entretanto nenhuma comprovação foi obtida até o

momento (Daling 1996, Gómez-Acebo, Dierssen-Sotos et al. 2016, Tadic, Cuspidi et al. 2019). Por outro lado, o uso de nifedipina aumentou a proliferação e migração de células tumorais de mama *in vitro*, causado por ativação de diferentes vias de sinalização e de forma independente à sua ação farmacológica nos VGCC (Guo, Zhang et al. 2014, Zhao, Guo et al. 2017).

JUSTIFICATIVA

Apresentando-se como um dos fatores de risco mais frequentes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, a hipertensão arterial também é uma comorbidade e um fator de risco bastante associada à pacientes oncológicos. Considerada a classe farmacológica mais prescrita pela clínica médica, os anti-hipertensivos são extremamente importantes no controle da pressão arterial. Entretanto, a correlação entre o uso desses medicamentos e um aumento no risco de desenvolver câncer de mama vêm sendo relatada por diferentes grupos de pesquisa.

Dentre os anti-hipertensivos, podemos citar o verapamil e a nifedipina, BCC que tiveram o seu uso relacionado ao desenvolvimento e/ou piores prognósticos do câncer de mama, além de aumentar a capacidade de migração e proliferação de células tumorais metastáticas. De forma concomitante, a expressão de VGCC e a produção de outros sinalizadores intracelulares controlados pela $[Ca^{2+}]_{IC}$ também se mostraram importantes no controle de processos celulares essenciais para o desenvolvimento e progressão dos tumores de mama.

Apesar dos dados obtidos até o momento não apresentarem um consenso acerca do tema, recentemente o uso crônico (acima de 10 anos) dos BCC mostrou estar associado à um maior risco de mulheres desenvolverem câncer de mama. Entretanto, o mecanismo responsável pela possível associação do uso crônico de BCC como fator de risco para o câncer de mama ainda permanece desconhecido. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo identificar o possível mecanismo de ação por detrás dessa associação, tendo como foco as vias de sinalização dependentes de Ca^{2+}/AMPc.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo desde trabalho é verificar se o uso prolongado dos BCC, verapamil e nifedipina, se apresenta como um potencial fator de risco para o desenvolvimento e progressão de tumores de mama, através de mecanismos que envolvem a vias de sinalização de Ca^{2+}/AMPc e/ou a expressão de VGCC do tipo L e T.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da administração de verapamil e nifedipina na capacidade de proliferação das células epiteliais da mama (tumorais e não-tumorais).

- Avaliar a presença de correntes macroscópicas produzidas por VGCC do tipo L e T em células epiteliais da mama (tumorais e não-tumorais).

- Mensurar a $[Ca^{2+}]_{IC}$ após a administração aguda e prolongada de verapamil e nifedipina em células epiteliais da mama (tumorais e não-tumorais).

- Avaliar o efeito da administração prolongada de verapamil e nifedipina na via de sinalização dependente de Ca^{2+}/AMPc, através da identificação e quantificação das seguintes proteínas: $Ca_v1.2$, $Ca_v3.2$, SERCA, NCX, TRPC6, CAMKII, NFAT, NFκB, ERK1/2 e EPAC.

- Mensurar a concentração intracelular de AMPc antes e após a administração de Verapamil em células epiteliais da mama (tumorais e não-tumorais).

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular

Para a realização de todos os experimentos foram utilizadas células provenientes de glândula mamária não-tumoral (MCF-10A), de tumores primários de mama (MACL-1 e MGSO-3) e de tumor metastático de mama (MDA-MB-231) (**Figura 9**). As linhagens MACL-1 e MGSO-3 (Correa, Bertollo et al. 2009) foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Alfredo Miranda Góes (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil). Todas as células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose, Pyruvate*; #11995073 - GIBCO), suplementado com 10% de soro bovino fetal (#F2442 - Sigma-Aldrich), 1% de solução de penicilina/streptomicina (5.000 unidades de penicilina e 5 mg/mL de estreptomicina) (#P4458 - Sigma-Aldrich) e 1% de glutamina (#G7513 - Sigma-Aldrich), em uma estufa de CO_2 à 37 ^{o}C (Thermo Fisher Scientific). O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias e, ao atingir a confluência de repique (entre 70 a 90%), as células eram tripsinizadas (*Trypsin-EDTA solution* - #T4299, Sigma-Aldrich) e resuspendidas em meio DMEM suplementado para a utilização nos experimentos ou para a manutenção do cultivo. Todos os experimentos foram realizados com células entre as passagens 13 e 17, e os estoques de células foram mantidos sob congelamento em freezer -80 ^{o}C, suspensas em meio DMEM suplementado e 10% de DMSO (MERCK).

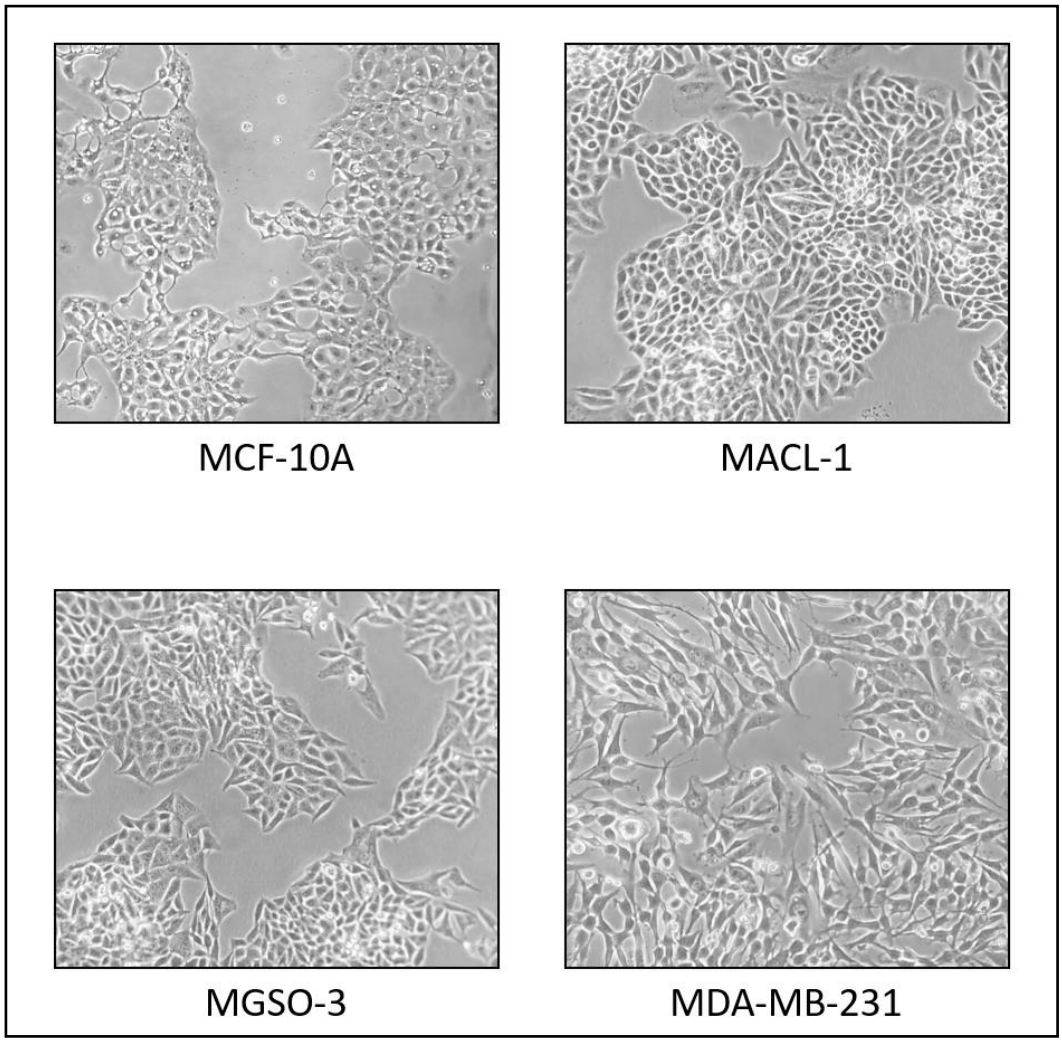

Figura 9 – Cultivo celular. Micrografias representativas para as linhagens celulares MCF-10A (não-tumoral), MACL-1, MGSO-3 (tumor primário) e MDA-MB-231 (tumor metastático), todas provenientes de tecido epitelial de mama. Imagens foram obtidas quando o cultivo celular apresentava uma confluência de aproximadamente 80%. Aumento de 100X.

4.2 Proliferação Celular – Ensaio de MTT

Para avaliar a ação dos BCC na proliferação celular, as células foram cultivadas até atingir uma confluência de 80 - 90 %, tripsinizadas e resuspendidas em 2 mL de meio DMEM suplementado para avaliação da viabilidade e contagem celular, através do uso de um hemocitômetro e do corante azul de Trypan (BioRad). Em seguida, as células eram semeadas em placas de 96 poços (Sarstedt) em uma concentração de 1 x 10^4 células/poço. Após 24 h do plaqueamento, as células foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 h com as seguintes soluções: meio DMEM suplementado + veículo (DMSO 0,1%), meio DMEM suplementado + verapamil (10, 30, 100 e 300 µM) (Sigma-Aldrich) e meio DMEM suplementado + nifedipina (1, 3, 10 e 30

µM) (Sigma-Aldrich). A cada 24 h, as soluções eram trocadas a fim de minimizar a degradação e manter constante a concentração dos compostos analisados. Ao final do período de incubação, as soluções eram removidas e adicionado 100µL de meio DMEM suplementado e 20µL de MTT 5 mg/mL (Sigma-Aldrich) (PBS como veículo). As células eram, então, incubadas por 4 h, com posterior remoção do conteúdo de cada poço e adição de 100µL de DMSO. A placa foi mantida sob agitação por 20 minutos e a leitura da absorbância de cada poço foi realizada por um espectrofotômetro (Epoch – BioTek Instruments) em 570 nm. Foram realizados dois experimentos independentes, com amostras em quadruplicatas.

4.3 Proliferação Celular – Viabilidade Celular

Para avaliar a ação dos BCC na proliferação/viabilidade celular, as células foram cultivadas até atingir uma confluência de 80 - 90 %, tripsinizadas e resuspendidas em 2 mL de meio DMEM suplementado para avaliação da viabilidade e contagem celular, através do uso de um hemocitômetro e do corante azul de Trypan (BioRad). Em seguida, as células eram semeadas em placas de 24 poços (Sarstedt) em uma concentração de 2×10^4 células/poço. Após 24 h, as células foram mantidas sem soro bovino fetal por 18 h para a sincronização do ciclo celular. As células foram, então, incubadas por 24, 48, 72 e 96 h com as seguintes soluções: meio DMEM suplementado + veículo (DMSO 0,1%), meio DMEM suplementado + verapamil (10, 30, 100 e 300 µM) (Sigma-Aldrich) e meio DMEM suplementado + nifedipina (1, 3, 10 e 30 µM) (Sigma-Aldrich). A cada 24 h, as soluções eram trocadas a fim de minimizar a degradação e manter constante a concentração dos compostos analisados. Ao final do período de incubação, as soluções eram removidas e adicionado 500µL de PBS para a remoção completa do meio de cultura. Para a contagem das células, as mesmas foram tripsinizadas (100 µL), ressuspendidas em meio DMEM suplementado e contabilizadas, em presença de azul de Trypan, pelo TC20 Automated Cell Counter (BioRad Laboratories). Foram realizados dois experimentos independentes, com amostras em duplicatas.

4.4 Eletrofisiologia Celular

As correntes macroscópicas de Ca^{2+} foram medidas através da técnica de *Patch-Clamp*, no modo *"whole-cell voltage-clamp"* (Hamill, Marty et al. 1981). Após o repique celular, as células eram resuspendidas e plaqueadas em lamínulas redondas com 18 mm de diâmetro

(Glasscyto), mantidas com meio DMEM suplementado e em estufa úmida de CO_2 a 37 ºC. Após 48 h, uma lamínula era transferida para uma nova placa contendo *Tyrode* modificado (para avaliar as correntes de Ca^{2+} do tipo L utilizou-se, em mM: 140 NMDG-Cl, 5 CsCl, 5 $BaCl_2$, 10 HEPES e 10 Glicose – pH ajustado para 7,4 adicionando CsOH; e para avaliar as correntes de Ca^{2+} do tipo T, a solução usada foi, em mM: 140 NMDG-Cl, 5 CsCl, 5 $CaCl_2$, 10 HEPES e 10 Glicose – pH ajustado para 7,4 adicionando CsOH). Pipetas de vidro (1,5mm de diâmetro, não heparinizada; Perfecta Lab) foram confeccionadas por um estirador vertical (PP-830; Narishige) e preenchidas com solução salina (em mM: 130 CsCl, 20 TEACl, 5 EGTA, 4 ATP-Mg^{2+} and 10 HEPES; o pH da solução foi ajustado para 7,2 adicionando CsOH ou TEAOH). Os valores das resistências não-compensadas das pipetas de *patch* variaram de 1,5 a 4,0 MΩ. Com o auxílio de um microscópio invertido (Eclipse TS100; Nikon Instruments), foram selecionadas apenas células isoladas e que apresentavam a membrana celular íntegra para a obtenção dos registros.

A aproximação da pipeta acoplada ao *headstage*, conectado à entrada do amplificador de *patch-clamp* EPC 10 USB (HEKA Elektronik), à membrana plasmática era realizada com o auxílio de um micromanipulador (MP285; Sutter Instruments). Uma sucção suave era realizada para a formação do "gigaselo" (um contato estreito entre a pipeta e a membrana celular, cuja resistência elétrica pode alcançar valores maiores que 10^9 Ω), seguida por uma sucção subsequente mais vigorosa para a obtenção da configuração *whole-cell*, com o rompimento da membrana celular e a diálise da solução interna para o meio intracelular. Protocolos eram executados cerca de 2 minutos após a obtenção do *whole-cell*, a fim de permitir o equilíbrio entre os meios extra e intracelular. O acompanhamento da resistência elétrica e do transiente capacitivo, bem como os ajustes eletrônicos necessários para a realização controlada das medidas, foram feitos através do *software* Patch-Master (HEKA Elektronik). As células apresentaram uma resistência em série de 3,64 ± 0,4 MΩ. Para nenhum dos registros foi realizada a compensação eletrônica da mesma, uma vez que a queda de potencial pela resistência em série era desprezível. As correntes foram filtradas (Filtro tipo Bessel passa-baixa a 2,9 kHz) e a corrente de *leakage* foi removida manualmente para todos os registros.

O protocolo utilizado para a avaliação da presença de correntes macroscópicas de influxo produzidas pela ativação de VGCC do tipo L partia de um potencial de *holding* de -50 mV com o objetivo de inativar as correntes geradas pela ativação dos canais de Na^+ e por VGCC do tipo T. Em seguida, era aplicado o pulso teste em 0 mV por um período de 150 ms; o intervalo entre cada um dos pulsos era de 5 s (**Figura 10A**). Já o protocolo adotado para avaliar a presença

de correntes de influxo produzidas por VGCC do tipo T, também partia de um potencial de *holding* de -50 mV, mas apresentava um pré-pulso hiperpolarizante em -100 mV por 150 ms. Somente então, os pulsos testes eram aplicados em um potencial de -30 mV por 50 ms, sendo mantido o intervalo de 5 s entre cada um dos pulsos (**Figura 10B**). O potencial de junção líquida foi calculado e apresentou um valor de 9,2 mV, sendo que o mesmo não foi corrigido. O *software* Fitmaster (versão 2x90.2; HEKA Elektronik, Alemanha) foi utilizado para a análise dos registros.

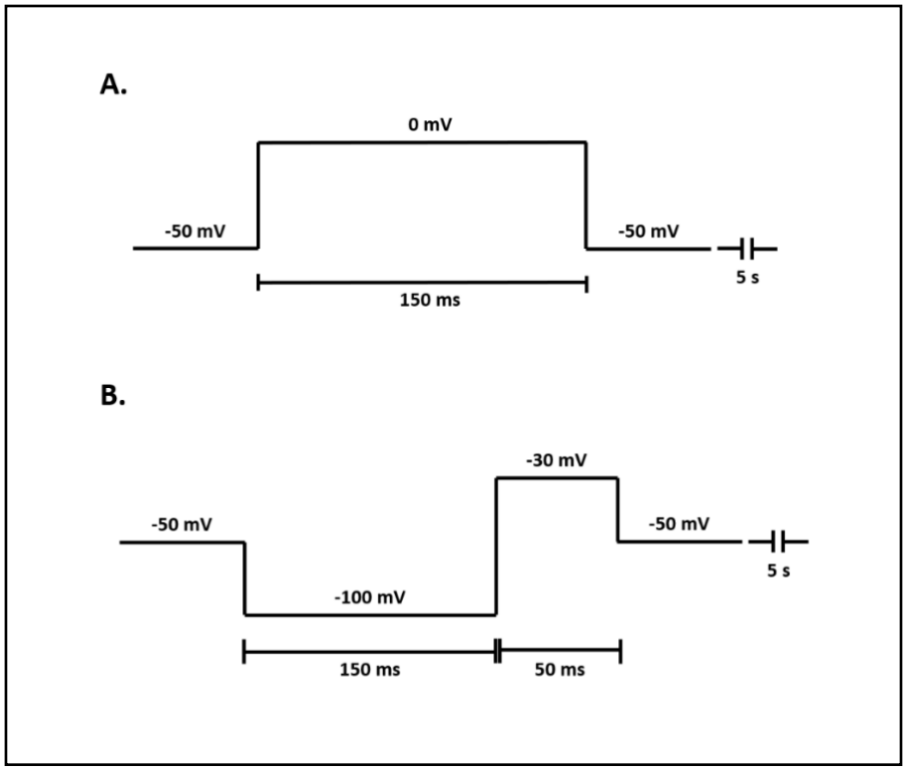

Figura 10 – Protocolos para eletrofisiologia. (A) Protocolo para obtenção da corrente macroscópica de Ca^{2+} do tipo L. Partindo de um potencial de holding de -50 mV, um pulso despolarizante a 0 mV é aplicado por 150 ms. Um intervalo de 5 s era feito entre cada pulso. (B) Protocolo para obtenção da corrente macroscópica de Ca^{2+} do tipo T. A partir de um potencial de holding de -50 mV, um pré-pulso hiperpolarizante a -100 mV é aplicado por 150 ms e seguido por um pulso despolarizante a -30 mV por 50 ms. Um intervalo de 5 s era feito entre cada um dos pulsos.

4.5 Avaliação da Concentração Intracelular de Ca^{2+}

Para a avaliação da $[Ca^{2+}]_{IC}$, as células foram cultivadas até confluência de 80 - 90 %, tripsinizadas e resuspendidas em 2 mL de meio suplementado para avaliação da viabilidade e contagem celular, através do uso de um hemocitômetro e do corante azul de Trypan. Para os

experimentos que avaliaram o efeito agudo dos BCC, as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro com 24 mm de diâmetro (Glasscyto) em uma concentração de 2 x 10^4 células e mantidas em estufa úmida de CO_2 (37 ºC) por 24 h para permitir a adesão celular. Então, as células eram carregadas com 5 µM da sonda Fluo-4 AM (#F23917, Invitrogen) por 30 minutos, seguido por três lavagens com PBS para remover o excesso da sonda. As células eram mantidas em solução *Tyrode* (em mM: 130 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 0.5 $MgCl_2$, 0.33 Na_2HPO_4, 11 Glicose, 5 HEPES; suplementado com 50 µU/mL de Insulina e o pH ajustado para 7,4 com NaOH) durante a aquisição das imagens, que foram obtidas em um microscópio confocal (Carl Zeiss LSM 880) por um protocolo em *time-lapse*, sendo uma imagem gerada a cada 1,27 s, com excitação em 488 nm e emissão acima de 500 nm. Após 1 minuto de aquisição, era aplicado o BCC (30 ou 100 µM verapamil; 3 ou 10 µM nifedipina - concentração final) e os efeitos eram acompanhados durante 4 minutos.

Já para os experimentos que avaliaram o efeito prolongado dos BCC, as células foram plaqueadas em *4-well chambered coverglass slips* em uma concentração de 2 x 10^4 células/poço e mantidas em estufa úmida de CO_2 (37 ºC) por 24 h. Em sequência, um novo meio de cultura contendo o veículo (DMSO 0,001%) ou o BCC (30 ou 100 µM verapamil; 3 ou 10 µM nifedipina) era adicionado e as células incubadas por 96 h; as soluções eram trocadas a cada 24 h. Ao final do período de incubação, as células eram carregadas com 5 µM da sonda Fluo-4 AM por 30 minutos, seguidas por três lavagens com PBS para remover o excesso da sonda. A aquisição das imagens foi realizada em um microscópio de fluorescência (Carl Zeiss Axio Imager), com excitação em 488 nm e emissão acima de 500 nm. Em ambos, a variação de intensidade da fluorescência nas imagens para $[Ca^{2+}]_{IC}$ foi quantificada através do *software* Image J (versão 1.52a, NIH).

4.6 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Para monitorar os efeitos dos BCC na concentração intracelular de de AMP cíclico, as células MCF-10A e MDA-MB-231 foram transfectadas (Lipofectamina 2000, Invitrogen) com os plasmídeos contendo os sensores, Epac-camps ou AKAR4, a fim de estabelecer clones estáveis. As células transfectadas foram mantidas em cutivo (meio DMEM supementado) para expansão do cultivo e, ao atingir uma confluência de 80%, as células eram tripsinizadas e utilizadas para os experimentos de FRET ou para o congelamento e armazenamento dos clones. Os experimentos de FRET foram realizados 48 h após o repique das células, que foram mantidas em solução tyrode a 24 ºC e monitoradas por um microscópio de fluorescência durante todo o

experimento. As variações no FRET foram medidas a cada 5 segundos e a intensidade de emissão de fluorescência de 480/545 nm subtraída de fundo em excitação a 430 nm. Valores são expressos como a média ± SEM.

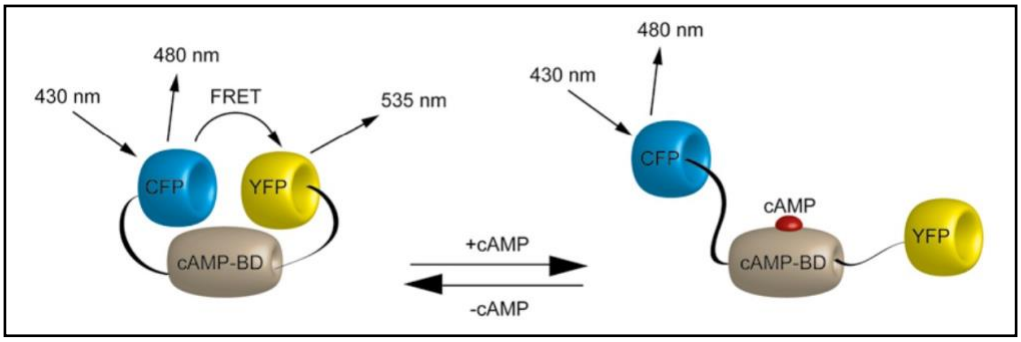

Figura 11 – Representação esquemática do sensor Epac1_amps. O sensor utilizado para a realização dos experimentos de FRET é composto por uma proteína fluorescente azul (CFP) e uma proteína fluorescente amarela (YFP) associadas ao domínio de ligação do AMPc com a proteína EPAC. Na ausência ou em baixas concentrações do AMPc, é possível visualizar a ocorrência da transferência de energia entre CFP e YFP. Porém, com o aumento da concentração desse sinalizador intracelular, o sensor passa por uma mudança conformacional e a transferência de energia deixa de ocorrer. Figura de (Stangherlin, Koschinski et al. 2014).

4.7 Western-Blot

Ao atingir uma confluência de 50 - 60%, as células foram incubadas com 0,1% DMSO, 30 µM verapamil ou 10 µM nifedipina. Ao final das 96 h de incubação, as células foram submetidas ao protocolo de extração das proteínas totais. Primeiramente, o meio de cultura era removido e 3 mL de PBS gelado eram adicionados a garrafa de cultura (75 cm^2); durante 3 minutos era realizada uma leve agitação da garrafa, permitindo a passagem da solução por toda a superfície da garrafa. Em seguida, o PBS era removido e 550 µL de tampão de lise (RIPA buffer; MERCK, EUA) com inibidores de proteases (P2714; Sigma-Aldrich, EUA) e fosfatases (Na_3VO_4; Sigma-Aldrich, EUA) eram adicionados a garrafa e, com o auxílio de um *cell scraper* (Sarstedt, Alemanha), feita a remoção das células aderidas.

O conteúdo foi transferido para um tubo eppendorf, onde 6 ciclos de homogeneização com 5 minutos de descanso foram realizados. Ao final, a amostra foi centrifugada por 12 minutos, a 9.000 rpm, em uma temperatura de 4 ºC, e o sobrenadante removido e dividido em alíquotas para armazenamento em freezer -80 ºC para uso posterior. A quantificação das proteínas totais presentes em cada amostra foi feita utilizando o método de *Lowry*, conforme descrito anteriormente (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

50 μg de proteínas foram separados por SDS/PAGE (Bio-Rad Laboratories, EUA) e transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P; EMD Millipore, EUA), previamente sensibilizada. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau 0,5% (Ponceau S; AMRESCO, EUA) a fim de confirmar a eficácia da transferência. 3 lavagens de 5 minutos com TBS-*Tween* (0,3%) (Tween 20; AMRESCO, EUA) foram realizadas, seguido pelo bloqueio da membrana com leite em pó (5%) (Molico Desnatado; Nestlé, Brasil) diluído em TBS-*Tween* por 1 h. A membrana foi, então, incubada *overnight* com os anticorpos para as proteínas de interesse (**Tabela 2**). 3 lavagens de 5 minutos com TBS-*Tween* foram realizadas, seguida pela incubação com o respectivo anticorpo secundário por 2 h.

A membrana passou novamente por 3 lavagens com TBS-*Tween* e foi revelada por detecção quimioluminescente (Immobilon Forte Western HRP; MERCK) (ImageQuant LAS 4000; General Electric, EUA). As análises foram feitas através do software ImageJ (versão 1.52a, NIH) e a quantidade de proteína foi expressa como proporção das densidades ópticas. HSP90 ou β-actina foram utilizados como normalizadores.

Anticorpos	Diluição	Fonte
β-actina	1:1000	SC-69879 (Santa Cruz)
$Ca_v1.2$	1:200	SC-16229R (Santa Cruz)
$Ca_v3.2$	1:200	SC-16263 (Santa Cruz)
CAMKII total	1:1000	07-1496 (Milllipore)
CAMKII fosforilada	1:500	12716 (Cell Signaling)
EPAC1	1:200	4155S (Cell Signaling)
ERK1/2 total	1:1000	9102L (Cell Signaling)
ERK1/2 fosforilada	1:600	4377S (Cell Signaling)
HSP90	1:2000	SC-13119 (Santa Cruz)
NCX1	1:500	SC-32881 (Santa Cruz)
NFAT	1:1000	SC-8405 (Santa Cruz)
NFκB total	1:500	SC-372 (Santa Cruz)
NFκB fosforilada	1:500	3031 (Cell Signaling)
SERCA2	1:200	SC-8094 (Santa Cruz)
TRPC6	1:500	AB47679 (Abcam)

Tabela 2 – Lista de anticorpos primários utilizados para o *western-blot*.

4.8 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e foi aceito como diferença estatisticamente significante qualquer comparação que resultou em um $p < 0,05$. As comparações entre os resultados obtidos na proliferação celular foram realizadas utilizando o teste de análise de variância a dois fatores (ANOVA *two-way*), juntamente com o teste de Holm-Sidak para comparações múltiplas. Já as análises relacionadas ao Ca^{2+} intracelular, nos experimentos com exposição prolongada utilizamos o ANOVA *one-way* com o teste de Holm-Sidak para as comparações múltiplas; já para os experimentos com exposição aguda, o ANOVA *two-way* com Holm-Sidak foi adotado. Utilizamos o ANOVA *two-way* com o teste de Bonferroni para as análises do *western-blot*, enquanto para as análises de FRET foi escolhido ANOVA *one-way* com o teste de Bonferroni. Graph Pad Prism 8 (GraphPad, EUA) foi utilizado para a confecção dos gráficos e realização das análises estatísticas.

RESULTADOS

5.1 O uso prolongado de verapamil e nifedipina promoveu alterações na capacidade de proliferação celular para as linhagens MCF-10A, MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231.

Para investigar os possíveis efeitos do uso agudo e prolongado dos BCC na proliferação celular, utilizamos o ensaio de MTT. Levando em consideração que, para o bloqueio de 90% da corrente de influxo produzida por canais do tipo L ou T, em cardiomiócitos, é de 100 μM para verapamil e de 10 μM para nifedipina (Alexander, Mathie et al. 2019), o desenho experimental escolhido contou com o uso de quatro diferentes concentrações: 10, 30, 100 e 300 μM verapamil e 1, 3, 10 e 30 μM nifedipina, após 24, 48, 72 e 96 h de incubação.

Ao analisar os resultados obtidos para a linhagem MCF-10A, não-tumoral, podemos observar que a proliferação celular não apresentou diferenças expressivas para os tempos 24 e 48 h, ao contrário do que foi observado após 72 e, principalmente, 96 h de incubação. O uso de verapamil após 72 e 96 h mostro u-se com duas tendências: enquanto valores menores que 100 μM levaram a um aumento na proliferação celular (1,71 ± 0,11 para 10 μM e 1,87 ± 0,10 para 30 μM), 100 μM não apresentou diferenças na proliferação em relação ao controle (**Figura 12A**). Já a exposição à nifedipina em doses iguais ou inferiores à 10 μM aumentou a proliferação celular em aproximadamente 60% (1,56 ± 0,13 para 1 μM, 1,62 ± 0,17 para 3 μM e 1,57 ± 0,09 para 10 μM) em relação ao controle, após 96 h de incubação (**Figura 12B**).

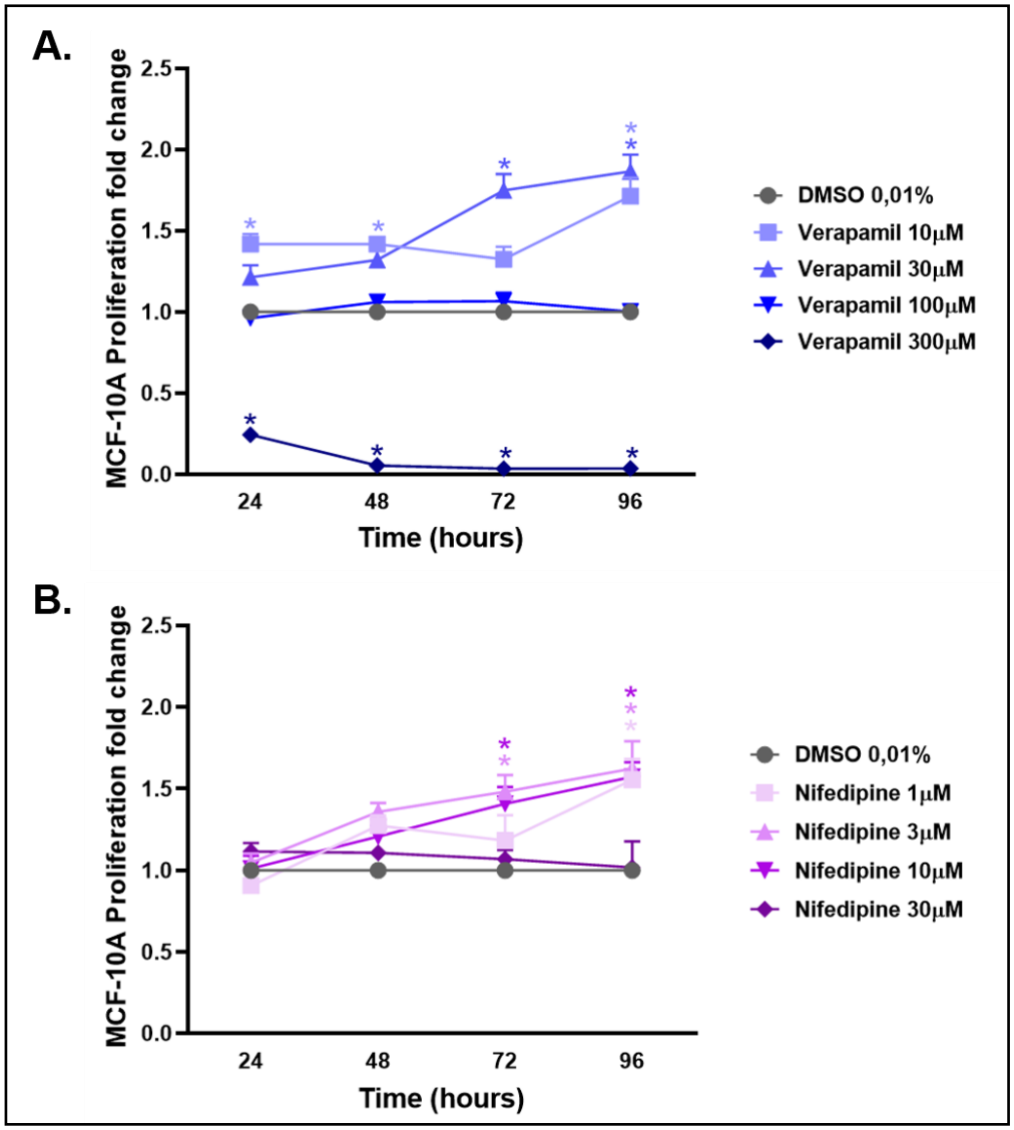

Figura 12 – Efeitos dos BCC na proliferação de células não-tumorais MCF-10A. As variações na proliferação celular da linhagem MCF-10A foram avaliadas após a exposição das células à diferentes concentrações de verapamil (10, 30, 100 e 300 µM) (A) ou nifedipina (1, 3, 10 e 30 µM) (B) em 24, 48, 72 e 96 h através do ensaio de MTT. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO (para um mesmo tempo de exposição).

A fim de confirmar as alterações encontradas, realizamos a avaliação da proliferação celular através da contagem de células viáveis com azul de Trypan. Considerando que as principais alterações foram visualizadas utilizando 30 e 100 µM de verapamil e 3 e 10 µM de nifedipina, selecionamos apenas essas concentrações para o ensaio. Ao contrário do que foi observado pelo MTT, 100 µM de verapamil reduziu a proliferação celular a partir de 72 h de incubação ($1{,}27 \times 10^5 \pm 1{,}71 \times 10^4$ para 72 h e $7{,}95 \times 10^4 \pm 2{,}74 \times 10^4$ para 96 h), enquanto 30 µM não teve nenhum efeito (**Figura 13A**). Já os dados encontrados para a nifedipina

corroboram os resultados anteriores, com um aumento da proliferação celular para ambas as concentrações testadas após 96 h (4,08 x 10^5 ± 2,86 x 10^4 para 3 µM e 3,97 x 10^5 ± 5,68 x 10^4 para 10 µM) (**Figura 13B**).

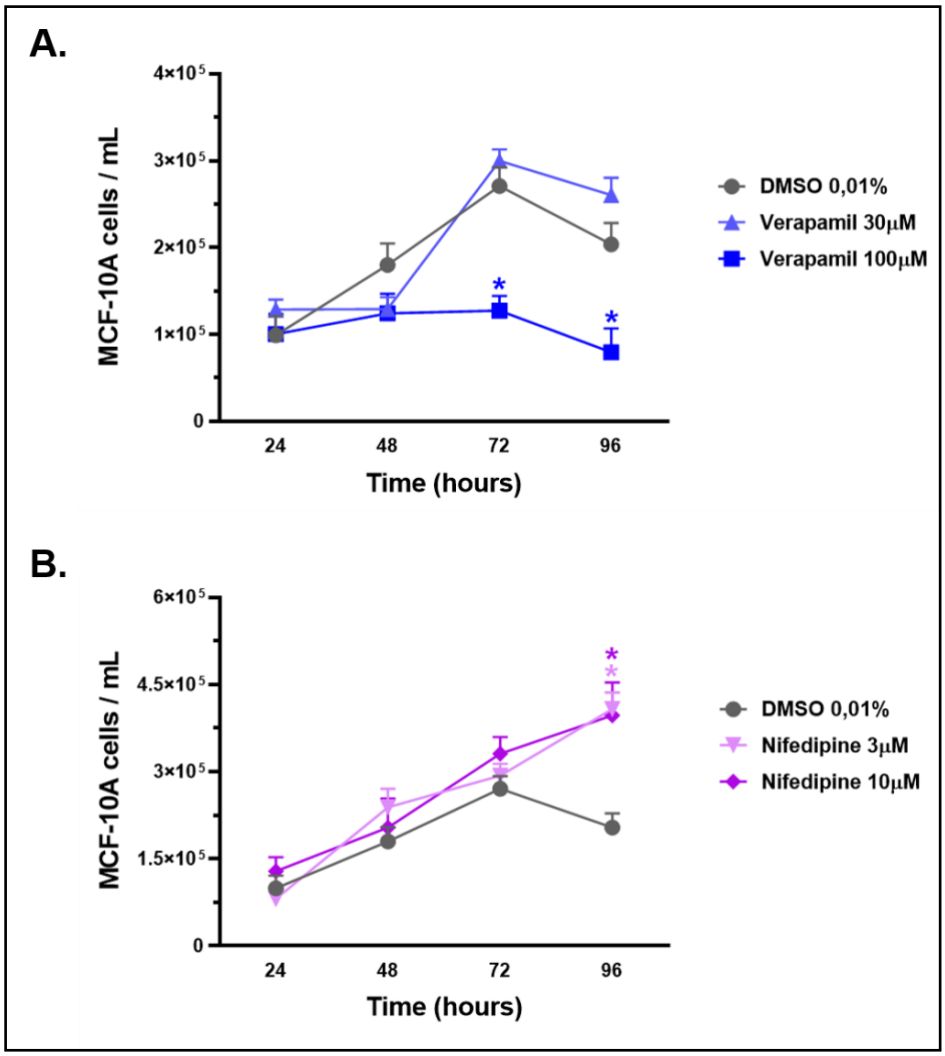

Figura 13 – Efeitos dos BCC na proliferação de células não-tumorais MCF-10A. As variações na proliferação celular da linhagem MCF-10A foram avaliadas após a exposição das células à diferentes concentrações de verapamil (30 e 100 µM) ou nifedipina (3 e 10 µM) em 24, 48, 72 e 96 h através da avaliação da viabilidade celular com azul de Trypan. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. * vs. DMSO (para um mesmo tempo de exposição).

Para a linhagem tumoral MACL-1, os resultados encontrados para os tempos 24 e 48 h são semelhantes aos obtidos para MCF-10A, não havendo diferença nos níveis de proliferação celular. A exposição ao verapamil continuou demonstrando tendências diferentes, com um aumento da proliferação celular para as concentrações de 10 µM e 30 µM (1,46 ± 0,06 e 1,35 ±

0,07, respectivamente), enquanto 100 µM inibiu a proliferação de MACL-1 com valores próximos à 50% (0,51 ± 0,05) após 96 h (**Figura 14A**). Também foi possível observar um aumento de aproximadamente 40% na proliferação celular em concentrações igual ou inferiores à 10 µM de nifedipina quando comparado ao controle (1,49 ± 0,06 para 1 µM, 1,38 ± 0,05 para 3 µM e 1,42 ± 0,06 para 10 µM após 96 h) (**Figura 14B**).

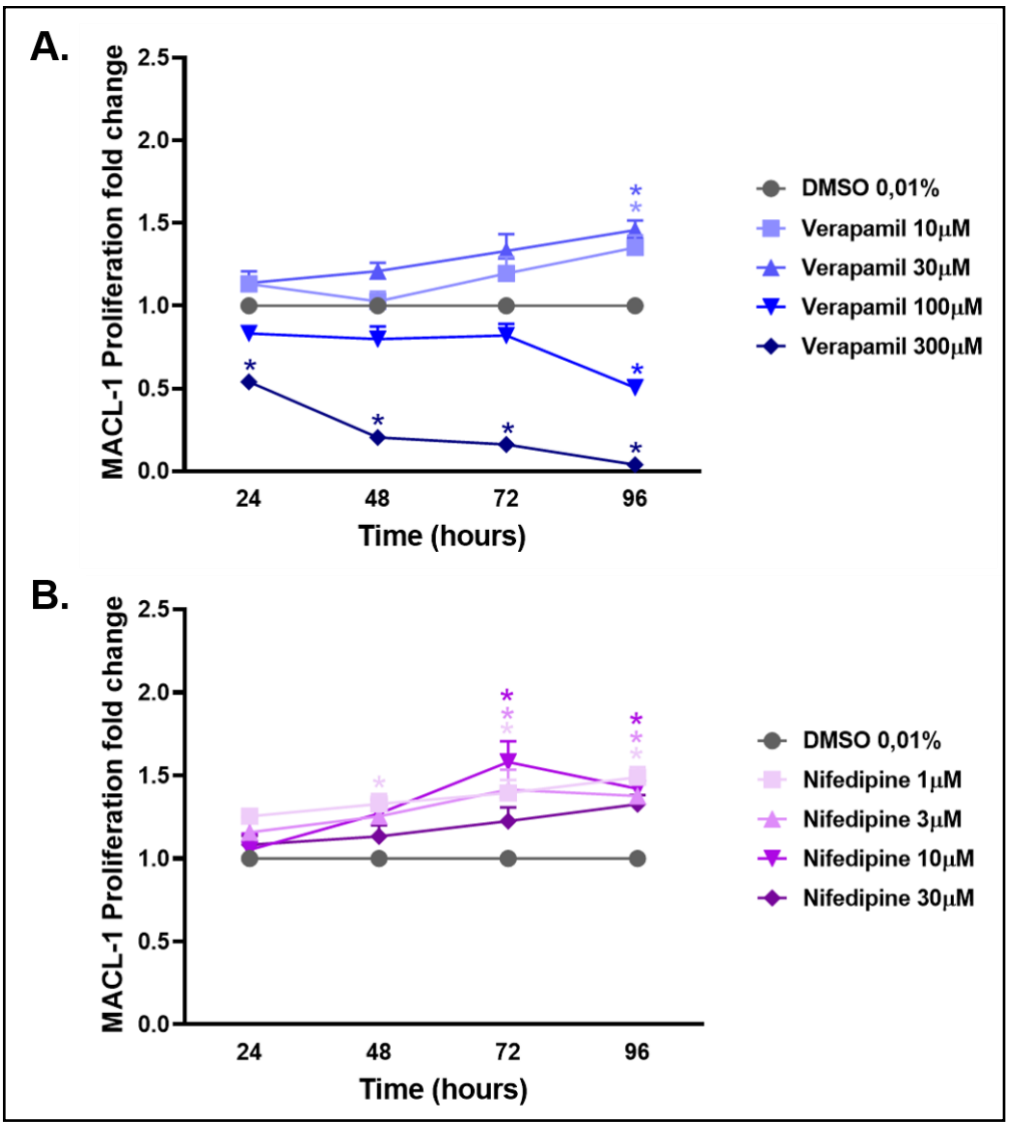

Figura 14 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MACL-1. As variações na proliferação celular da linhagem MACL-1 foram avaliadas após a exposição das células à diferentes concentrações de verapamil (10, 30, 100 e 300 µM) ou nifedipina (1, 3, 10 e 30 µM) em 24, 48, 72 e 96 h através do ensaio de MTT. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO (para um mesmo tempo de exposição).

Os resultados encontrados para proliferação celular de MACL-1 através da viabilidade celular corroboraram que a exposição dessas células a 100 µM de verapamil por 96 h foi capaz de reduzir a proliferação dessas células em 76% (7,63 x 10^5 ± 7,03 x 10^4), enquanto 3 e 10 µM de nifedipina por 96 h aumentou a proliferação em 27% (4,08 x 10^6 ± 3,34 x 10^5) e 17% (3,77 x 10^6 ± 1,91 x 10^5), respectivamente, em comparação com o grupo controle (3,21 x 10^6 ± 1,18 x 10^5) (**Figura 15**).

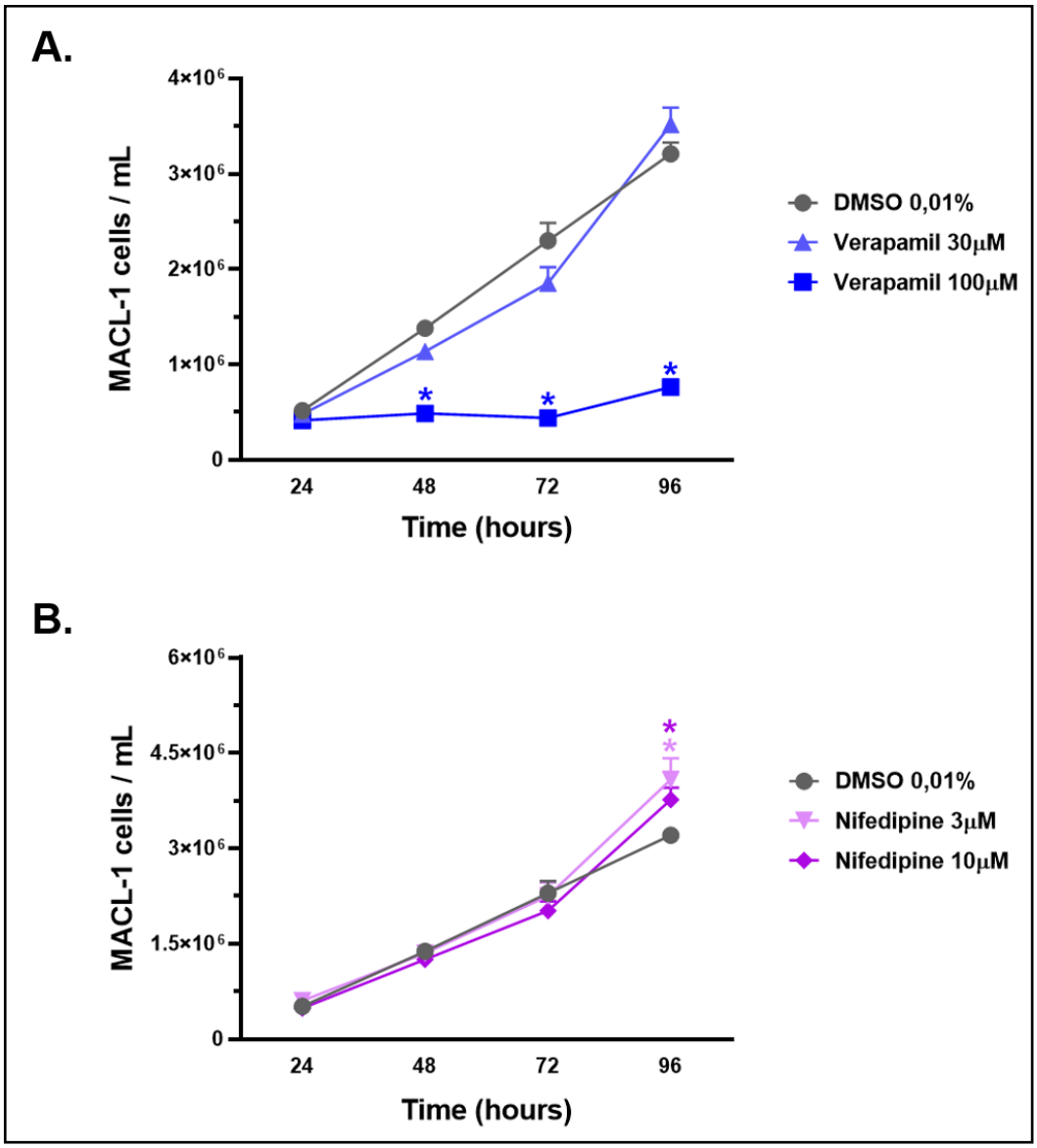

Figura 15 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MACL-1. As variações na proliferação celular da linhagem MACL-1 foram avaliadas após a exposição das células à diferentes concentrações de verapamil (30 e 100 µM) ou nifedipina (3 e 10 µM) em 24, 48, 72 e 96 h através da avaliação da viabilidade celular com azul de Trypan. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO (para um mesmo tempo de exposição).

Já para as células da linhagem MGSO-3, ao contrário dos resultados observados para as demais linhagens celulares avaliadas, o verapamil reduziu ou não alterou a proliferação celular (**Figura 16A**). Para a concentração de 100 µM, observou-se uma redução de 36% (0,64 ± 0,05) e de 66% (0,34 ± 0,04) após 72 e 96 h de incubação, respectivamente. Já o aumento da proliferação celular causado pela nifedipina pode ser visualizado a partir de 48 h de exposição, com valores de 1,39 ± 0,03 para 3 µM e 1,36 ± 0,07 para 10 µM após 48 h, e 1,43 ± 0,07 para 3 µM e 1,39 ± 0,06 para 10 µM após 72 h (**Figura 16B**).

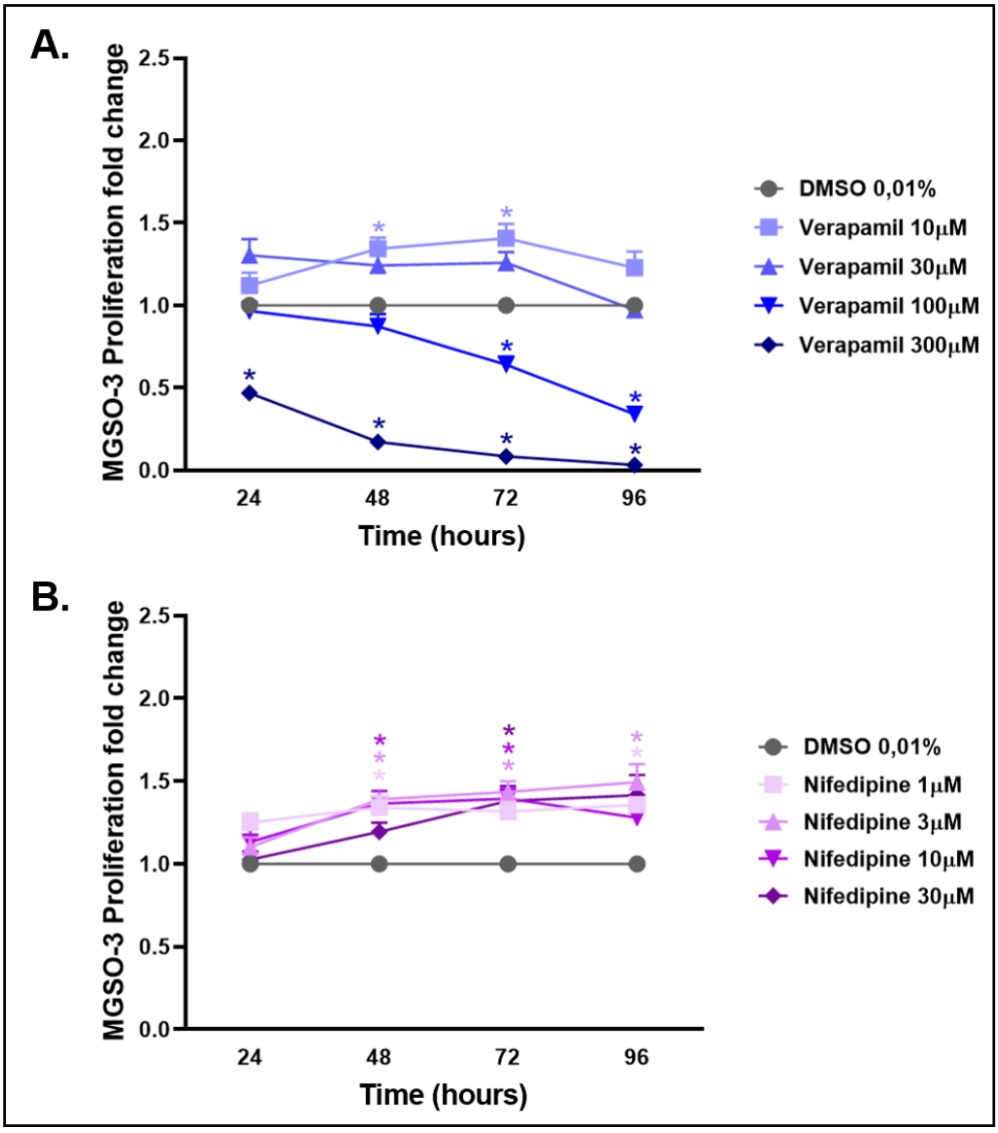

Figura 16 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MGSO-3. As variações na proliferação celular da linhagem MGSO-3 foram avaliadas após a exposição das células à diferentes concentrações de verapamil (10, 30, 100 e 300 µM) ou nifedipina (1, 3, 10 e 30 µM) em 24, 48, 72 e 96 h através do ensaio de MTT. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO (para um mesmo tempo de exposição).

Confirmando os dados obtidos para o MTT, a avaliação da viabilidade mostrou que a incubação de células MGSO-3 com 30 e 100 µM de verapamil reduziu a proliferação celular em 51% (9,16 x 10^5 ± 6,71 x 10^4) e 98% (4,47 x 10^4 ± 1,37 x 10^4) após 72 h e em 16% (2,06 x 10^6 ± 1,27 x 10^5) e 97% (1,55 x 10^5 ± 2,59 x 10^4) após 96 h, respectivamente, em relação ao controle (1,85 x 10^6 ± 1,36 x 10^5 para 72 h e 2,44 x 10^6 ± 3,08 x 10^5 para 96 h) (**Figura 17A**). Já a incubação com a nifedipina apresentou um aumento na proliferação após 96 h, com valores de 3,11 x 10^6 ± 4,16 x 10^4 para 3 µM e 3,19 x 10^6 ± 1,81 x 10^5 para 10 µM (**Figura 17B**).

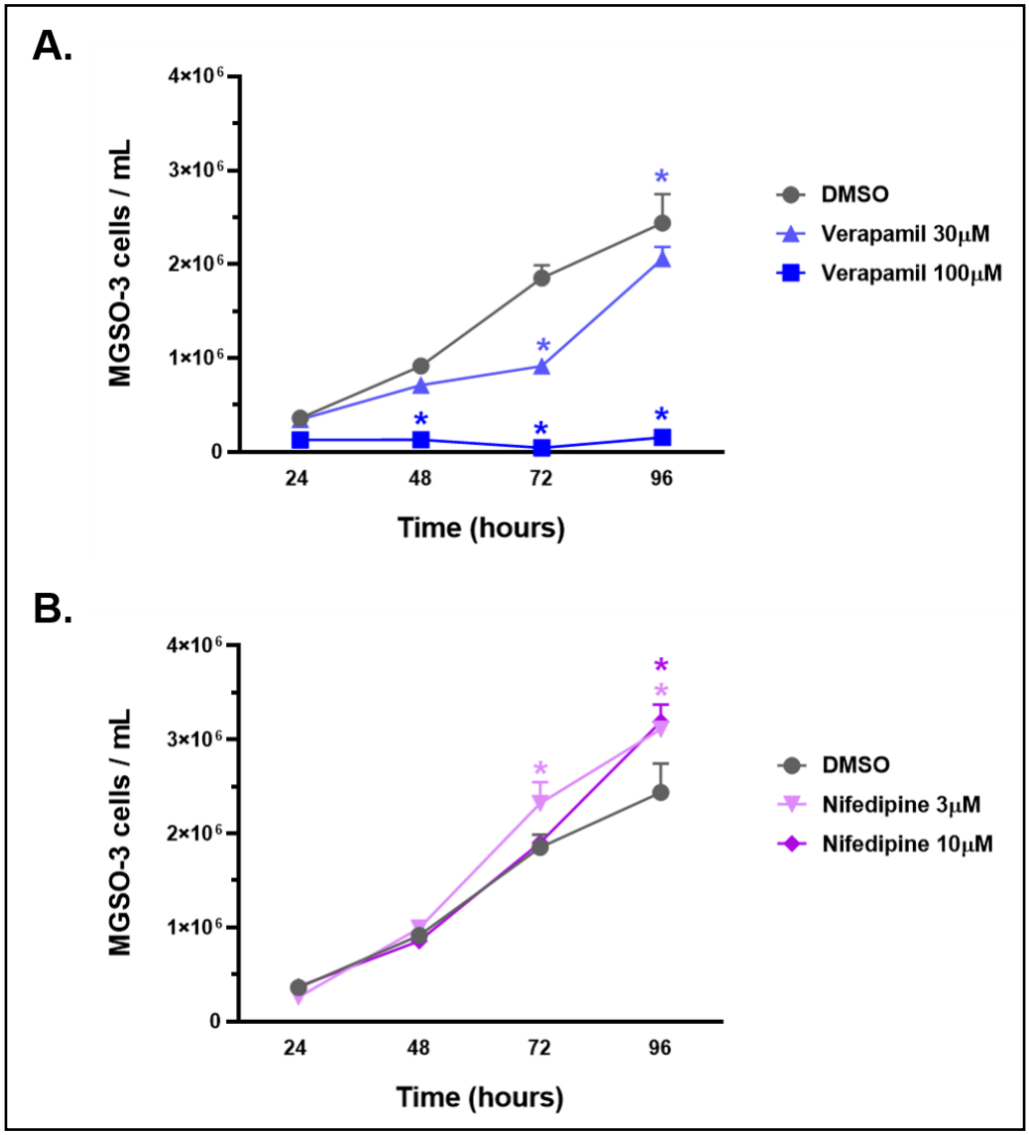

Figura 17 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MGSO-3. As variações na proliferação celular da linhagem MGSO-3 foram avaliadas após a exposição das células à diferentes concentrações de verapamil (30 e 100 µM) ou nifedipina (3 e 10 µM) em 24, 48, 72 e 96 h através da avaliação da viabilidade celular com azul de Trypan. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO (para um mesmo tempo de exposição).

Nesse mesmo sentido, células da linhagem MDA-MB-231, provenientes de um tumor em estágio metastático, demonstraram resultados similares à linhagem MGSO-3. Como é possível ver na **Figura 18A**, a exposição ao verapamil reduziu ou não alterou a proliferação dessas células. 100 µM desse bloqueador reduziu a proliferação celular em 54% (0,46 ± 0,01), 67% (0,33 ± 0,02) e 68% (0,32 ± 0,02) após 48, 72 e 96 h de exposição, respectivamente. Já a incubação com a nifedipina por 96 h aumentou a proliferação celular para as concentrações iguais ou inferiores a 10 µM (1,33 ± 0,06 para 1 µM, 1,32 ± 0,05 para 3 µM, 1,34 ± 0,04 para 10 µM) (**Figura 18B**).

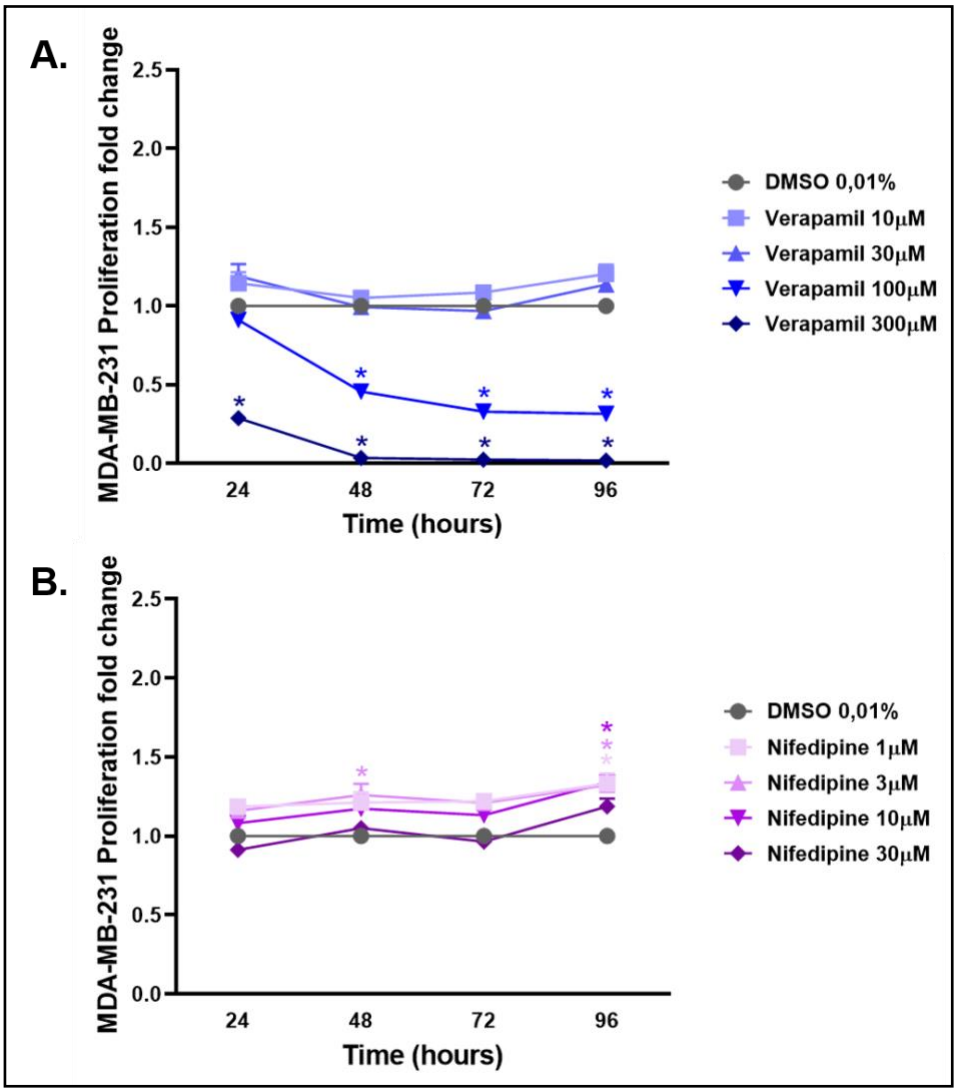

Figura 18 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MDA-MB-231. As variações na proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 foram avaliadas após a exposição das células à diferentes concentrações de verapamil (10, 30, 100 e 300 µM) ou nifedipina (1, 3, 10 e 30 µM) em 24, 48, 72 e 96 h através do ensaio de MTT. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO (para um mesmo tempo de exposição).

Quando avaliamos os resultados obtidos para proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 através da viabilidade celular, é possível dizer que, de fato, a exposição dessas células a 100 µM de verapamil por 72 ou 96 h foi capaz de reduzir a sua proliferação (7,55 x 10^5 ± 5,07 x 10^4) para 72 h e 1,15 x 10^6 ± 3,24 x 10^4 para 96 h), quando comparado ao grupo controle (1,53 x 10^6 ± 3,84 x 10^4 para 72 h e 1,42 x 10^6 ± 9,49 x 10^4 para 96 h). Da mesma forma, 3 e 10 µM de nifedipina por 96 h aumentou a proliferação em 72% e 61% (2,44 x 10^6 ± 5,71 x 10^4 e 2,28 x 10^6 ± 1,16 x 10^5), respectivamente (**Figura 19**).

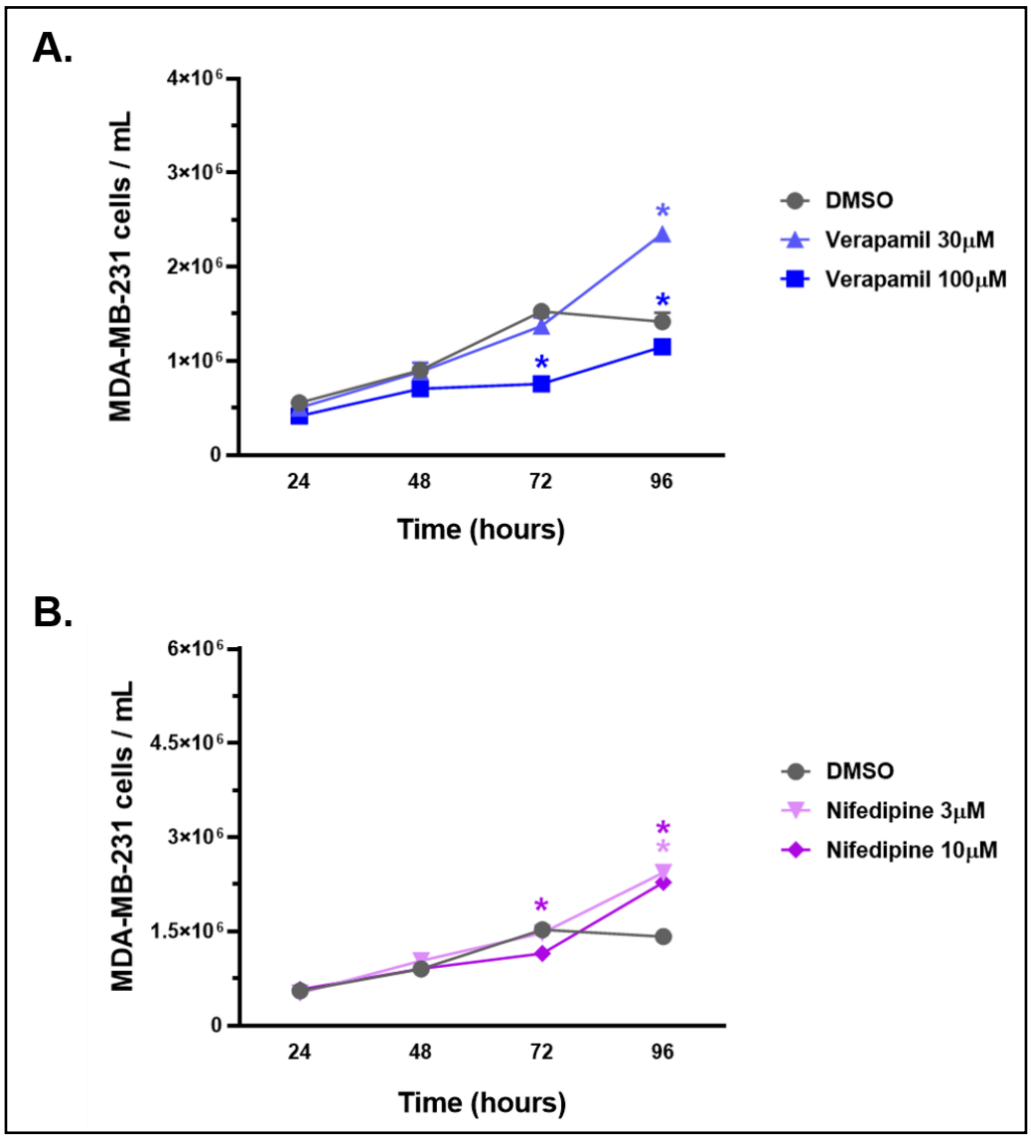

Figura 19 – Efeitos dos BCC na proliferação de células tumorais MDA-MB-231. As variações na proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 foram avaliadas após a exposição das células à diferentes concentrações de verapamil (30 e 100 µM) ou nifedipina (3 e 10 µM) em 24, 48, 72 e 96 h através da avaliação da viabilidade celular com azul de Trypan. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. * vs. DMSO (para um mesmo tempo de exposição).

5.2 As linhagens MCF-10A, MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 não apresentam correntes de Ca^{2+} produzidas pela abertura de VGCC do tipo L ou T.

Para compreender melhor sobre a atuação da nifedipina e do verapamil nos diferentes processos celulares, incluindo a proliferação, avaliamos a presença de VGCC do tipo L e T, principais alvos farmacológicos desses BCC, através da técnica de *patch-clamp*. Os registros obtidos pela eletrofisiologia celular demonstraram uma ausência de correntes macroscópicas de influxo para todas as linhagens analisadas, indicando que não há canais funcionais do tipo L (**Figura 20A**) ou do tipo T (**Figura 20B**).

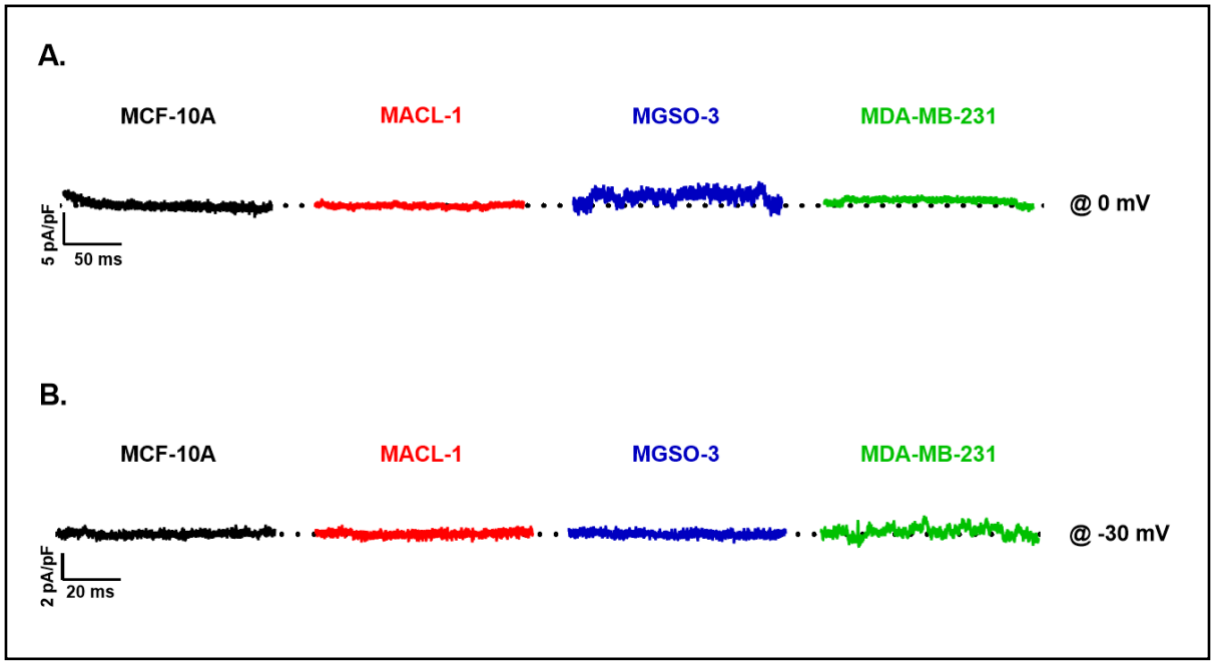

Figura 20 – Eletrofisiologia celular. (A) Traçados representativos dos registros eletrofisiológicos obtidos para VGCC do tipo L (n=5). (B) Traçados representativos dos registros eletrofisiológicos obtidos para VGCC do tipo T (n=5). As linhagens celulares MCF-10A, MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 foram representadas pelas cores preto, vermelho, azul e verde, respectivamente.

5.3 O uso prolongado de verapamil e nifedipina induz alterações na concentração intracelular de Ca^{2+} para as células tumorais e não-tumorais.

Tendo em vista que não foi encontrada a presença de correntes de influxo geradas pela abertura de VGCC, nosso próximo passo foi avaliar se o verapamil e a nifedipina estariam atuando no manejo do Ca^{2+}. Para isso, avaliamos a $[Ca^{2+}]_{IC}$ das células MCF-10A, MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 após exposição à 3 e 10 µM de nifedipina ou 30 e 100 µM de verapamil por 96 h. A primeira observação que podemos com os dados obtidos é em relação a concentração basal de Ca^{2+} intracelular. Células MDA-MB-231 apresentam uma $[Ca^{2+}]_{IC}$ de duas a três vezes maior (2,15 ± 0,32) quando em comparação com as demais linhagens (0,57 ± 0,05 para MCF-10A, 0,83 ± 0,05 para MACL-1 e 0,57 ± 0,09 para MGSO-3) (**Figura 21**).

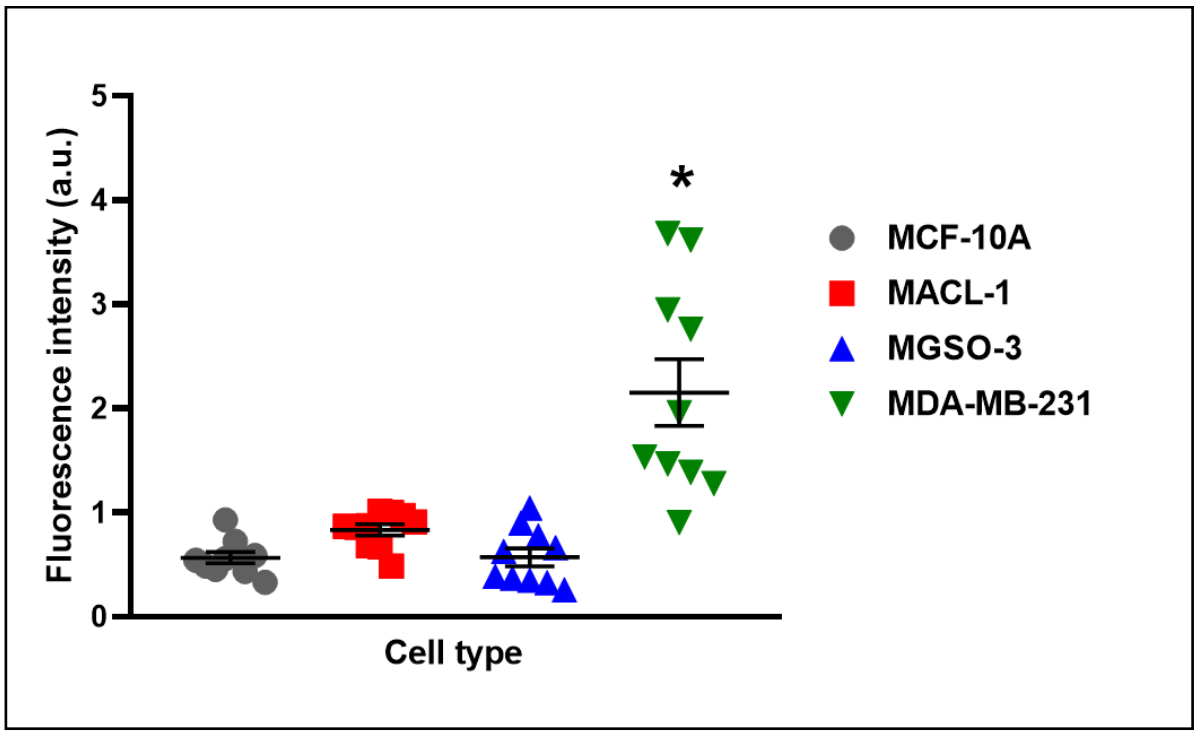

Figura 21 – $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais e não-tumorais. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da variação na intensidade da fluorescência apresentada pelas linhagens MCF-10A (cinza), MACL-1 (vermelho), MGSO-3 (azul) e MDA-MB-231 (verde) (n=10). Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *one-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. * vs. MCF-10A.

Outra observação feita a partir dos dados coletados é que o uso prolongado de verapamil e nifedipina, em ambas as concentrações testadas, aumentou a $[Ca^{2+}]_{IC}$ para células não-tumorais. Como é possível ver na **Figura 22**, a incubação com 30 e 100 µM de verapamil aumentou, de forma bastante expressiva, a fluorescência das células analisadas (2,48 ± 0,15 e 3,46 ± 0,36, respectivamente) em comparação com o grupo controle (0,57 ± 0,05). Da mesma forma, a exposição prolongada a 10 µM de nifedipina gerou um aumento de 3,4 vezes na fluorescência das células (1,93 ± 0,24).

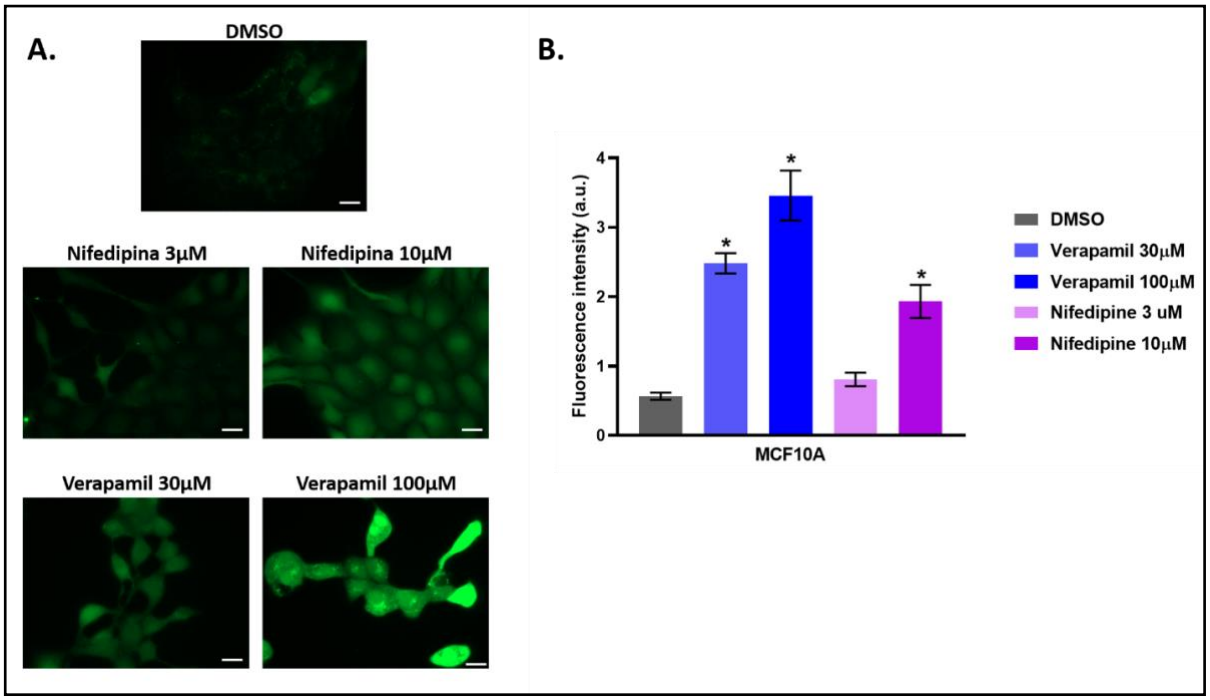

Figura 22 – Efeito prolongado dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células não-tumorais MCF-10A. A. Imagens representativas para células MCF-10A carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM após exposição à 30 e 100 µM de verapamil ou 3 e 10 µM de nifedipina por 96 h. DMSO utilizado como veículo. Barra de calibração: 20 µm. B. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da intensidade da fluorescência apresentada pelas células (n=10). Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *one-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO. a.u. unidade arbitrária.

Contrapondo esses dados, os resultados obtidos para as células da linhagem MACL-1 que foram expostas ao verapamil ou nifedipina demonstraram que os níveis de Ca^{2+} intracelular foram reduzidos (**Figura 23A**). As células que foram incubadas com 100 μM de verapamil tiveram uma redução em sua fluorescência de 23% (0,67 ± 0,05) em relação ao controle (0,87 ± 0,04). Já a nifedipina reduziu em 30% (para 3 μM (0,61 ± 0,03)) e em 22% (para 10 μM (0,68 ± 0,04; **Figura 23B**).

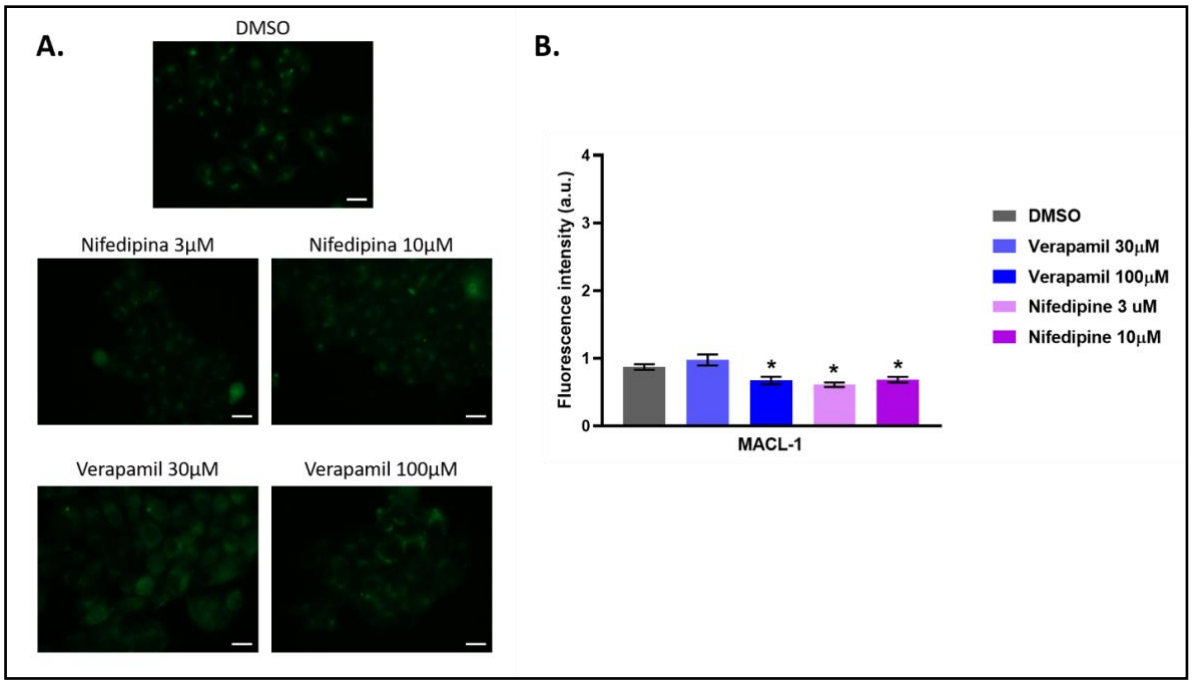

Figura 23 – Efeito prolongado dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MACL-1. A. Imagens representativas para células MACL-1 carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM após exposição à 30 e 100 μM de verapamil ou 3 e 10 μM de nifedipina por 96 h. DMSO utilizado como veículo. Barra de calibração: 20 μm. B. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da intensidade da fluorescência apresentada pelas células (n=10). Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *one-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. $*$ vs. DMSO. a.u. unidade arbitrária.

Já as células provenientes da linhagem MGSO-3 não sofreram nenhuma alteração na $[Ca^{2+}]_{IC}$ após 96 h de incubação com nifedipina, nas concentrações de 3 e 10 µM. Por outro lado, a exposição prolongada ao verapamil aumentou a concentração de Ca^{2+}. Com 30 µM de verapamil, a fluorescência apresentada por essas células tumorais aumentou em 2,8 vezes (1,59 ± 0,11), enquanto com 100 µM o aumento foi de 3,7 vezes (2,13 ± 0,32) em relação ao grupo controle (0,57 ± 0,09) (**Figura 24).**

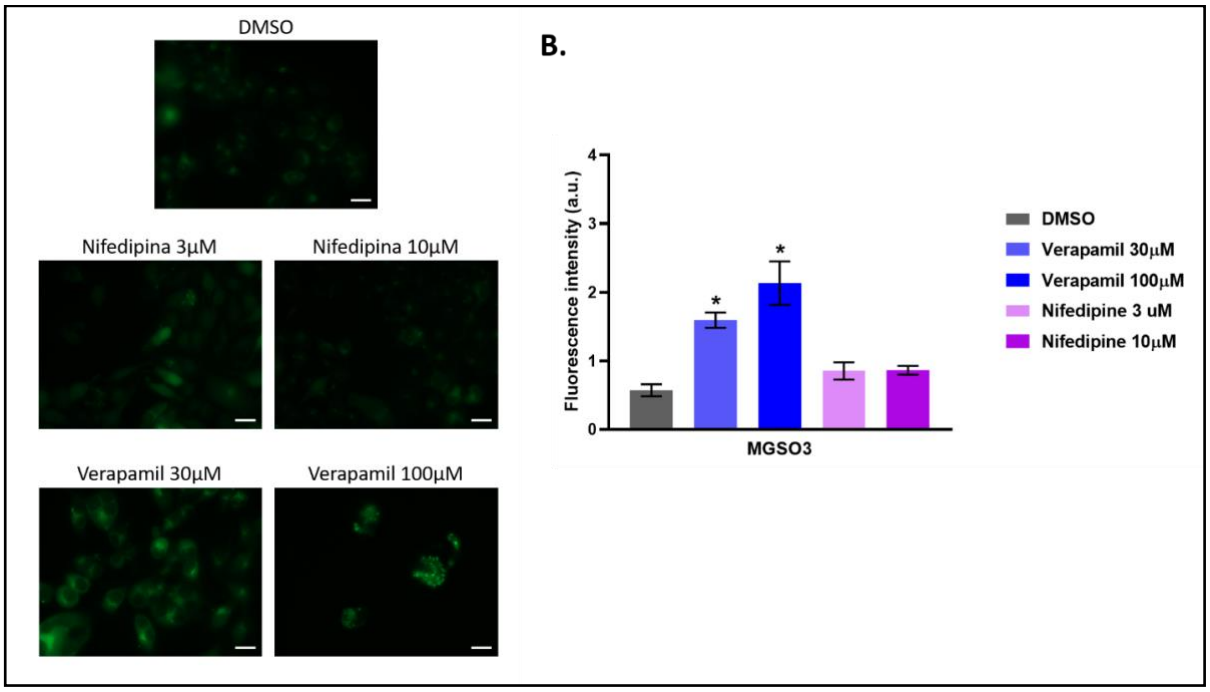

Figura 24 – Efeito prolongado dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MGSO-3. A. Imagens representativas para células MGSO-3 carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM após exposição à 30 e 100 µM de verapamil ou 3 e 10 µM de nifedipina por 96 h. DMSO utilizado como veículo. Barra de calibração: 20 µm. B. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da intensidade da fluorescência apresentada pelas células (n=10, exceto para 100 µM verapamil onde n=3). Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *one-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. $*$ vs. DMSO. a.u. unidade arbitrária.

Ao avaliar as células tumorais metastáticas, MDA-MB-231, o padrão de resposta foi diferente para cada um dos bloqueadores (**Figura 25A**). Em resposta a exposição prolongada com 100 µM de verapamil, a fluorescência das células apresentou um aumento de 4,7 vezes em comparação com o grupo controle (8,35 ± 0,00 e 1,78 ± 0,26, respectivamente). Já a nifedipina reduziu a $[Ca^{2+}]_{IC}$, com um decrésimo na fluorescência de 43% para a concentração de 3 µM (1,02 ± 0,09) (**Figura 25B**).

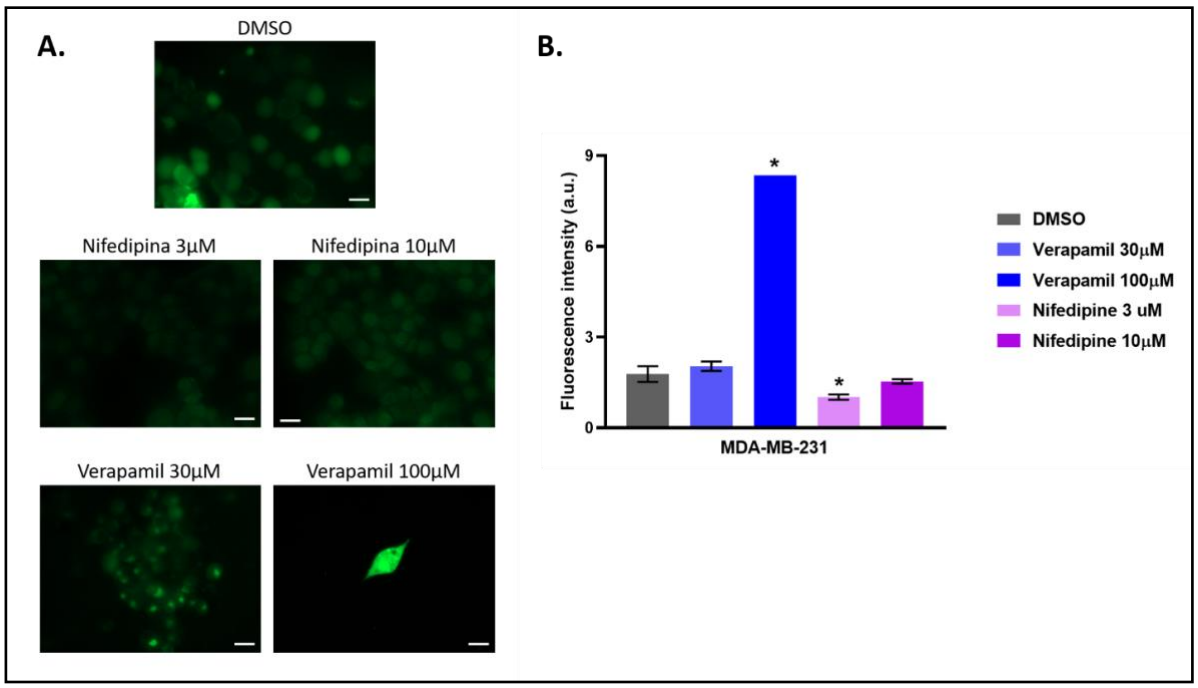

Figura 25 – Efeito prolongado dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MDA-MB-231. A. Imagens representativas para células MDA-MB-231 carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM após exposição à 30 e 100 µM de verapamil ou 3 e 10 µM de nifedipina por 96 h. DMSO utilizado como veículo. Barra de calibração: 20 µm. B. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da intensidade da fluorescência apresentada pelas células (n=10, exceto para 100 µM verapamil onde n=1). Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *one-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. $*$ vs. DMSO. a.u. unidade arbitrária.

5.4 As alterações na concentração intracelular de Ca^{2+}, em resposta ao verapamil e a nifedipina, são diferentes a depender do tempo de exposição ao fármaco.

Ainda na tentativa de compreender sobre como os bloqueadores de Ca^{2+}, verapamil e nifedipina, atuam na regulação de processos celulares (como a proliferação), nós avaliamos a variação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ antes e após a administração aguda de 30 e 100 μM de verapamil ou 3 e 10 μM de nifedipina para as quatro linhagens celulares (MCF-10A, MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231). Curiosamente, os resultados demonstraram que as variações no Ca^{2+} intracelular, causadas pela exposição a esses fármacos, pode ser diferente quando comparado os dois tempos de exposição. Por exemplo, células não-tumorais da linhagem MCF-10A tiveram uma redução de 9% na intensidade de fluorescência após a exposição aguda à 3 μM (0,94 ± 0,01 para t_0 e 0,86 ± 0,02 para t_{30}) e de 11% para 10 μM de nifedipina (0,97 ±0,01 para t_0, 0,89 ± 0,01 para t_{30}, 0,87 ± 0,02 para t_{60} e 0,86 ± 0,03 para t_{120}), ao contrário do que havia sido visualizado para a exposição prolongada (**Figura 26**). Da mesma forma, nenhuma das concentrações de verapamil teve efeito na $[Ca^{2+}]_{IC}$ para a exposição aguda em células MCF-10A.

Células tumorais MACL-1 mantiveram a redução na fluorescência em resposta a exposição ao verapamil (0,75 ± 0,02 após 30 μM de verapamil em comparação com 0,94 ± 0,01 antes da exposição) (**Figura 27**). Entretanto, a exposição aguda à nifedipina induziu um aumento da concentração de Ca^{2+} para ambas as concentrações testadas (em 3 μM: 0,96 ± 0,01 em t_0 e 1,18 ± 0,06 em t_{60}; em 10 μM: 0,96 ± 0,01 em t_0, 1,25 ± 0,07 em t_{30} e 1,17 ± 0,01 em t_{60}), em contraposição com os resultados que foram obtidos pela exposição prolongada, onde observamos uma redução na fluorescência apresentada pelas células.

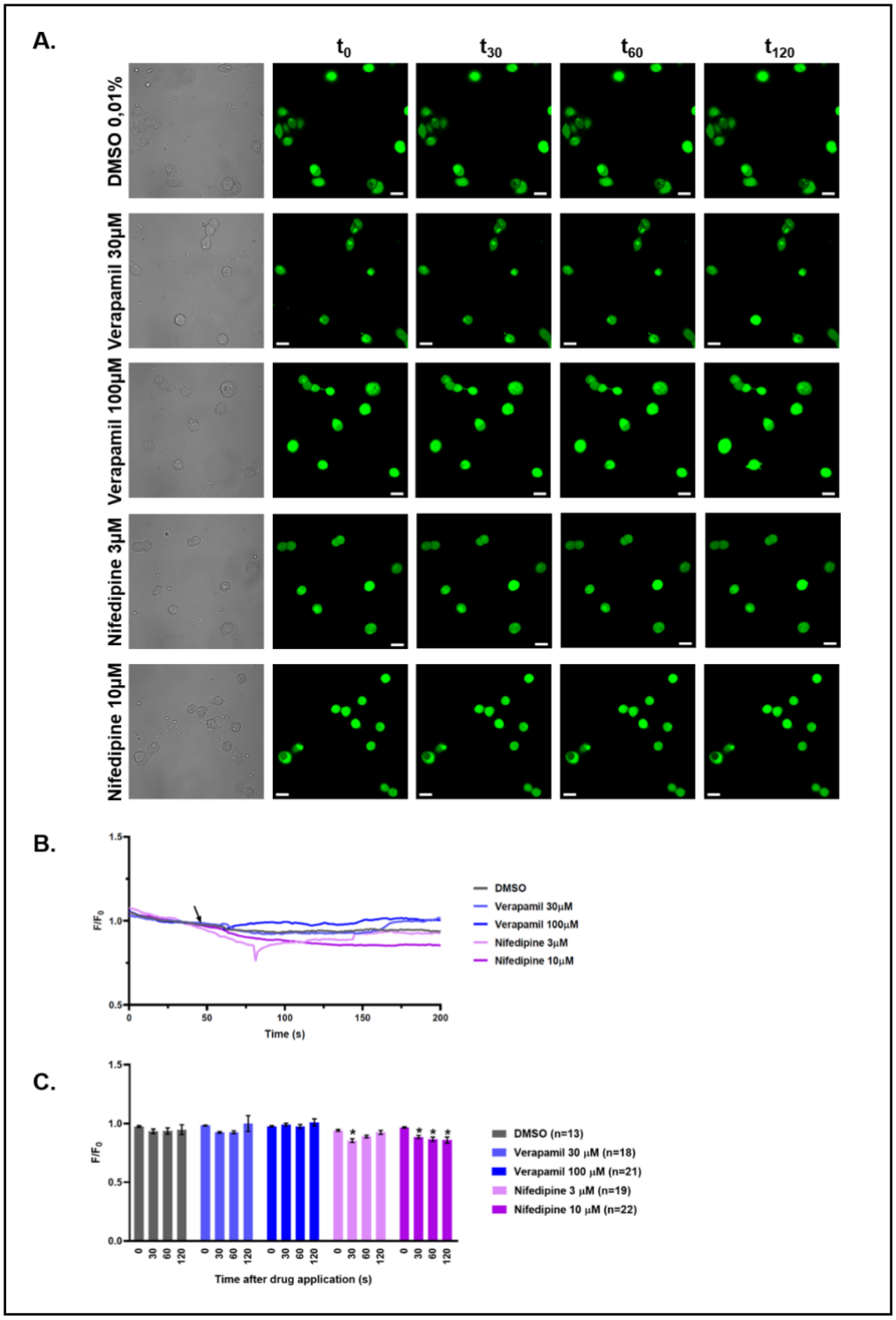

Figura 26 – Efeito agudo dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células não-tumorais MCF-10A. A. Imagens representativas para células MCF-10A carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM antes (t_0) e após 30 (t_{30}), 60 (t_{60}) e 90 (t_{90}) segundos de exposição à 30 e 100 µM de verapamil ou 3 e 10 µM de nifedipina. DMSO utilizado como veículo. Barra de calibração: 20 µm. B. Traçados da fluorescência média apresentada pelas células ao longo do tempo. Seta indicando o momento da aplicação dos bloqueadores. C. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da intensidade da fluorescência apresentada pelas células nos diferentes tempos e concentrações. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. $*$ vs. t_0.

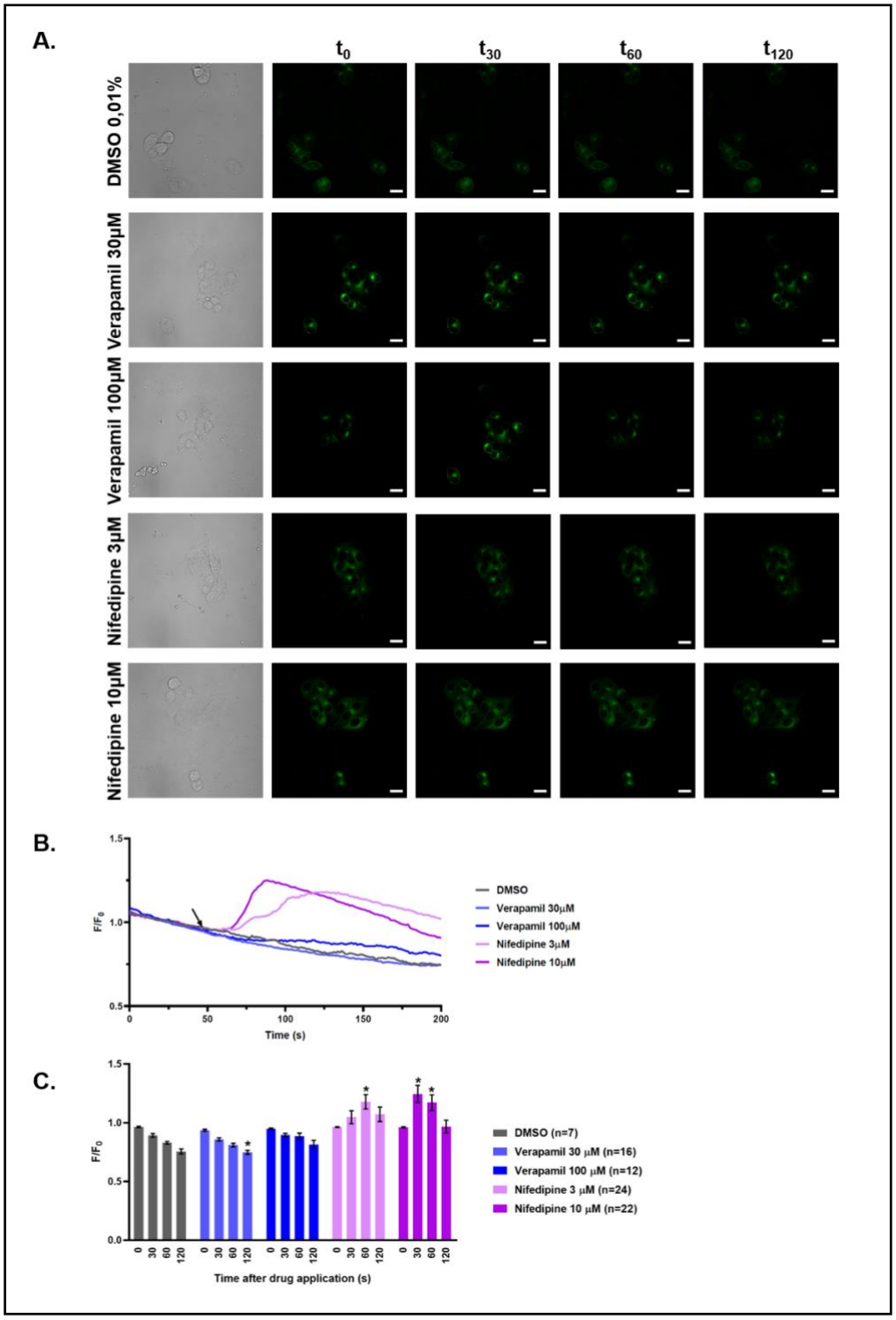

Figura 27 – Efeito agudo dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MACL-1. A. Imagens representativas para células MACL-1 carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM antes (t_0) e após 30 (t_{30}), 60 (t_{60}) e 90 (t_{90}) segundos de exposição à 30 e 100 µM de verapamil ou 3 e 10 µM de nifedipina. DMSO utilizado como veículo. Barra de calibração: 20 µm. B. Traçados da fluorescência média apresentada pelas células ao longo do tempo. Seta indicando o momento da aplicação dos bloqueadores. C. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da intensidade da fluorescência apresentada pelas células nos diferentes tempos e concentrações. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. t_0.

Em células MGSO-3, também tumorais, a exposição aguda a 100 μM de verapamil reduziu a intensidade de fluorescência das células em 18% (0,95 ± 0,01 em t_0, 0,81 ± 0,02 em t_{60} e 0,78 ± 0,05 em t_{120}), divergindo do que foi encontrado após a exposição prolongada (**Figura 28**). A nifedipina, por sua vez, apresentou uma resposta diferente para cada uma das concentrações testadas. Enquanto para 3 μM observamos uma redução de 14% na fluorescência das células (0,94 ± 0,01 em t_0, 0,81 ± 0,05 em t_{120}), para 10 μM houve um aumento de 13% (0,97 ± 0,01 em t_0, 1,10 ± 0,06 em t_{30}). Ambos os dados, encontrados após a exposição aguda à nifedipina, vão na contramão do que foi observado após a exposição prolongada, onde não foi observada nenhuma diferença na $[Ca^{2+}]_{IC}$.

Já as células tumorais metastáticas, MDA-MB-231, apresentaram resposta apenas à aplicação aguda de 30 μM de verapamil, com um aumento de 14% na intensidade de fluorescência (0,99 ± 0,02 em t_0 e 1,13 ± 0,06 em t_{120}) (**Figura 29**). Para os demais grupos, não foi observada nenhuma alteração na $[Ca^{2+}]_{IC}$.

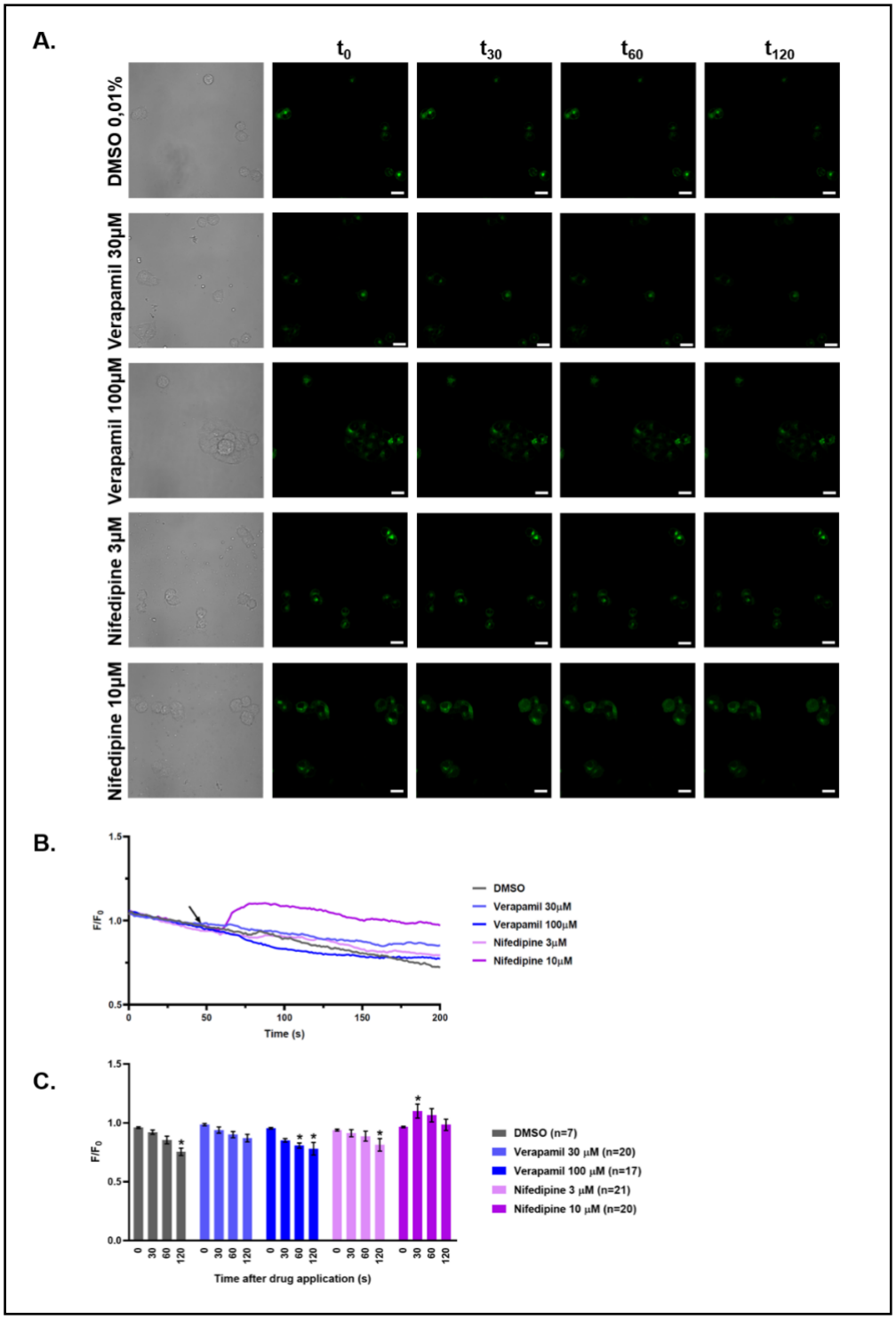

Figura 28 – Efeito agudo dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MGSO-3. A. Imagens representativas para células MGSO-3 carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM antes (t_0) e após 30 (t_{30}), 60 (t_{60}) e 90 (t_{90}) segundos de exposição à 30 e 100 µM de verapamil ou 3 e 10 µM de nifedipina. DMSO utilizado como veículo. Barra de calibração: 20 µm. B. Traçados da fluorescência média apresentada pelas células ao longo do tempo. Seta indicando o momento da aplicação dos bloqueadores. C. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da intensidade da fluorescência apresentada pelas células nos diferentes tempos e concentrações. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. t_0.

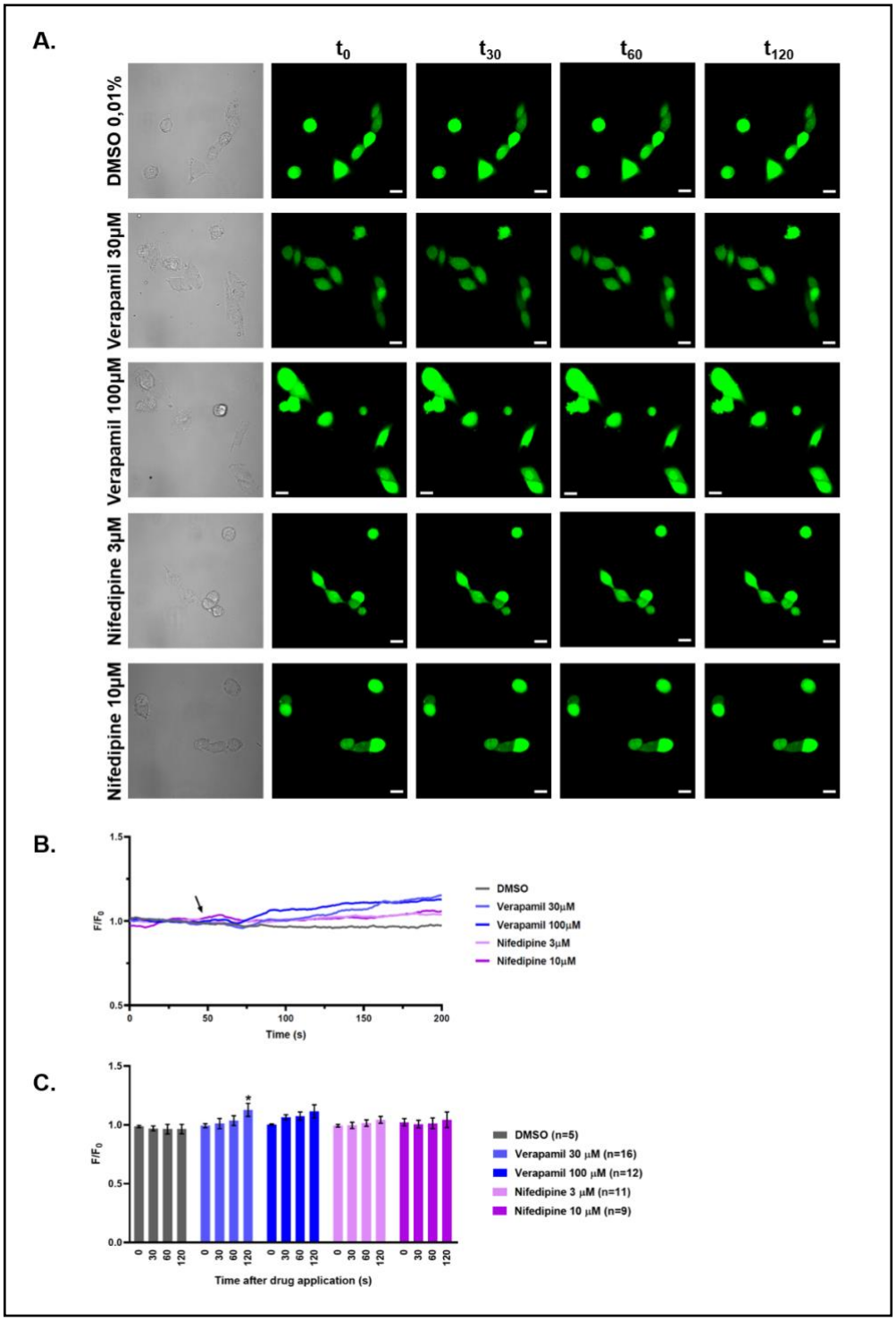

Figura 29 – Efeito agudo dos bloqueadores verapamil e nifedipina na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em células tumorais MDA-MB-231. A. Imagens representativas para células MDA-MB-231 carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM antes (t_0) e após 30 (t_{30}), 60 (t_{60}) e 90 (t_{90}) segundos de exposição à 30 e 100 µM de verapamil ou 3 e 10 µM de nifedipina. DMSO utilizado como veículo. Barra de calibração: 20 µm. B. Traçados da fluorescência média apresentada pelas células ao longo do tempo. Seta indicando o momento aplicação dos bloqueadores. C. Quantificação da $[Ca^{2+}]_{IC}$ através da intensidade da fluorescência apresentada pelas células nos diferentes tempos e concentrações. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Holm-Sidak para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. $*$ vs. t_0.

5.5 A exposição prolongada aos fármacos nifedipina e verapamil foi capaz de alterar diferentes vias de sinalização em células não-tumorais e tumorais.

Tendo em vista que a exposição prolongada de células tumorais e não-tumorais aos bloqueadores verapamil e nifedipina foi capaz de alterar a $[Ca^{2+}]_{IC}$, mesmo na ausência de VGCC, nosso próximo passo foi avaliar a expressão de algumas proteínas importantes no transporte desse íon através da membrana plasmática e de diferentes vias de sinalização intracelular que podem ser reguladas pelo Ca^{2+}. Dados obtidos através da técnica de *western-blot* demonstraram que a incubação com 30 μM de verapamil ou 10 μM de nifedipina não alterou a expressão de canais $Ca_v1.2$ e TRPC6 (**Figura 30**). Não somente, a expressão de $Ca_v3.2$, SERCA2, NCX1 também não foi observada em nenhuma das linhagens celulares analisadas.

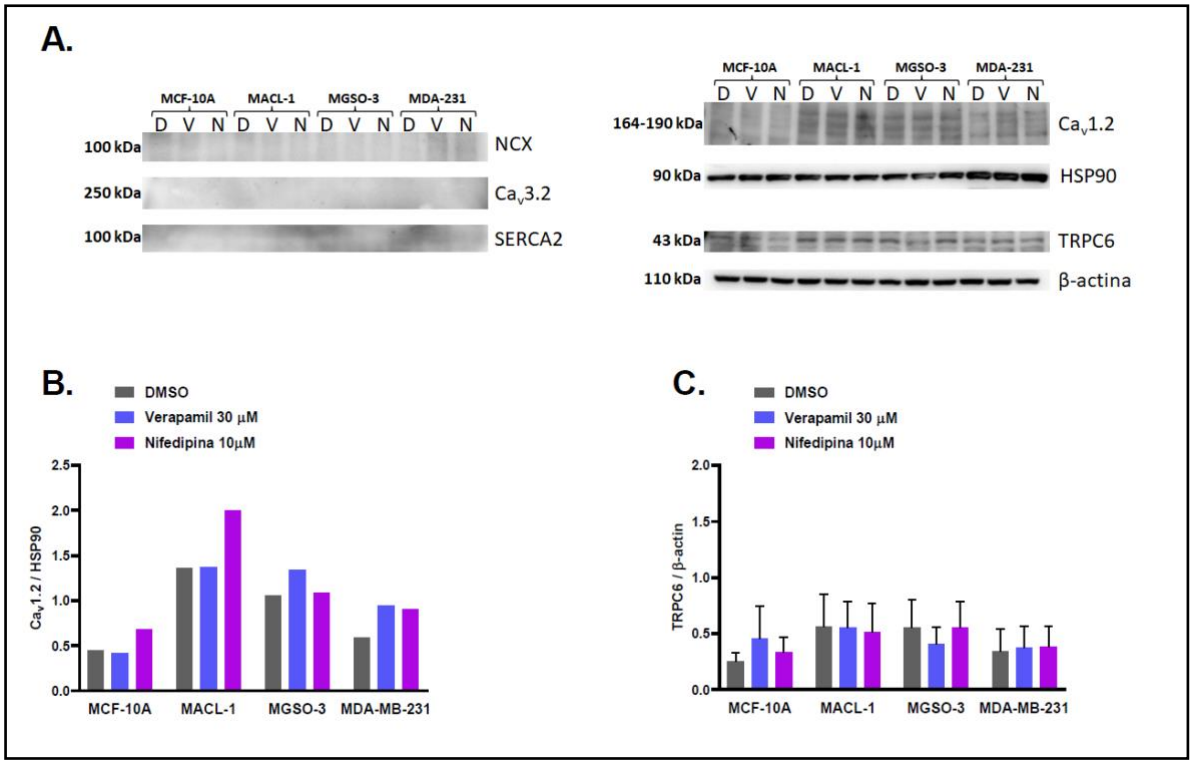

Figura 30 – Expressão de canais iônicos permeáveis ao Ca^{2+}. A. Imagens representativas para a expressão de $Ca_v1.2$ e TRPC6 após exposição à 30 μM de verapamil ou 10 μM de nifedipina por 96 h. As amostras foram apresentadas na seguinte ordem: D. DMSO, V. 30 μM verapamil, N. 10 μM nifedipina. B. Quantificação da expressão de $Ca_v1.2$ (n=2). HSP90 foi utilizado como normalizador. C. Quantificação da expressão de TRPC6 (n=3). β-actina foi utilizada como normalizador. Os valores estão apresentados como média (Fig. 30B) ou média ± EPM (Fig. 30C) e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Bonferroni para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO.

Uma enzima extremamente importante para a via de sinalização ativada pelo Ca^{2+} é a CAMKII. Ao avaliar níveis dessa enzima, nossos resultados apontam que a exposição prolongada aos BCC não alterou a expressão da mesma (**Figura 31B-D**). Ainda, a expressão das MAP quinases ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinase*) também foi avaliada e observamos que, após a incubação com os BCC, houve uma redução na expressão dessas quinases apenas em células MGSO-3 (1,48 ± 0,01 para DMSO, 1,05 ± 0,14 para 30 μM de verapamil e 1,05 ± 0,06 para 10 μM de nifedipina) (**Figura 31E**). Entretanto, não houve alterações na fosforilação dessa enzima (**Figura 31F-G**).

Alguns fatores de transcrição relacionados a via de sinalização do Ca^{2+} também foram analisados. O primeiro deles foi o NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), que não apresentou variações em sua expressão, exceto para as células MACL-1 (1,20 ± 0,13 para DMSO, 0,81 ± 0,14 para 30 μM de verapamil e 0,60 ± 0,08 para 10 μM de nifedipina) (**Figura 32B**). Já a expressão de NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)* foi reduzida em células tumorais e não-tumorais. A exposição prolongada à 30 μM de verapamil diminuiu a expressão de NFκB em células MCF-10A (1,60 ± 0,19 para DMSO e 0,82 ± 0,07 para 30 μM de verapamil) e MGSO-3 (1,31 ± 0,15 para DMSO e 0,75 ± 0,10 para 30 μM de verapamil) (**Figura 32C**), sendo que para esta última linhagem a redução também foi observada para a forma fosforilada (1,28 ± 0,04 para DMSO e 0,78 ± 0,06 para 30 μM de verapamil) (**Figura 32D**). De forma similar, a incubação com 10 μM de nifedipina também reduziu a expressão desse fator de transcrição em células MCF10A (1,01 ± 0,05 para 10 μM de nifedipina) e MDA-MB-231 (1,39 ± 0,11 para DMSO e 0,90 ± 0,05 para 10 μM de nifedipina). Assim como para as células MGSO-3, a redução na expressão de NFκB para as células tumorais metastáticas (MDA-MB-231) também foi visualizada para a sua forma fosforilada (1,35 ± 0,03 para DMSO e 0,89 ± 0,10 para 10 μM de nifedipina). Células MACL-1 apresentaram apenas uma redução na expressão de NFκB fosforilada após a exposição à nifedipina (1,14 ± 0,15 para DMSO e 0,53 ± 0,03 para 10 μM de nifedipina) (**Figura 32D**).

Tendo em vista a possível comunicação entre as vias de sinalização reguladas pelo Ca^{2+} e pelo AMPc, buscamos avaliar a expressão de EPAC1 (*exchange protein activated by cAMP*), um importante efetor *downstream* de AMPc. Nossos resultados evidenciam que exposição aos BCC foi capaz de inibir a expressão de EPAC1 em células não-tumorais MCF-10A (0,69 ± 0,13 para DMSO, 0,30 ± 0,09 para 30 μM de verapamil e 0,34 ± 0,02 para 10 μM de nifedipina) (**Figura 32F**). Células MDA-MB-231 também demonstraram uma redução na expressão dessa

proteína apenas em resposta ao verapamil (0,65 ± 0,01 para DMSO e 0,32 ± 0,02 para 30 µM de verapamil).

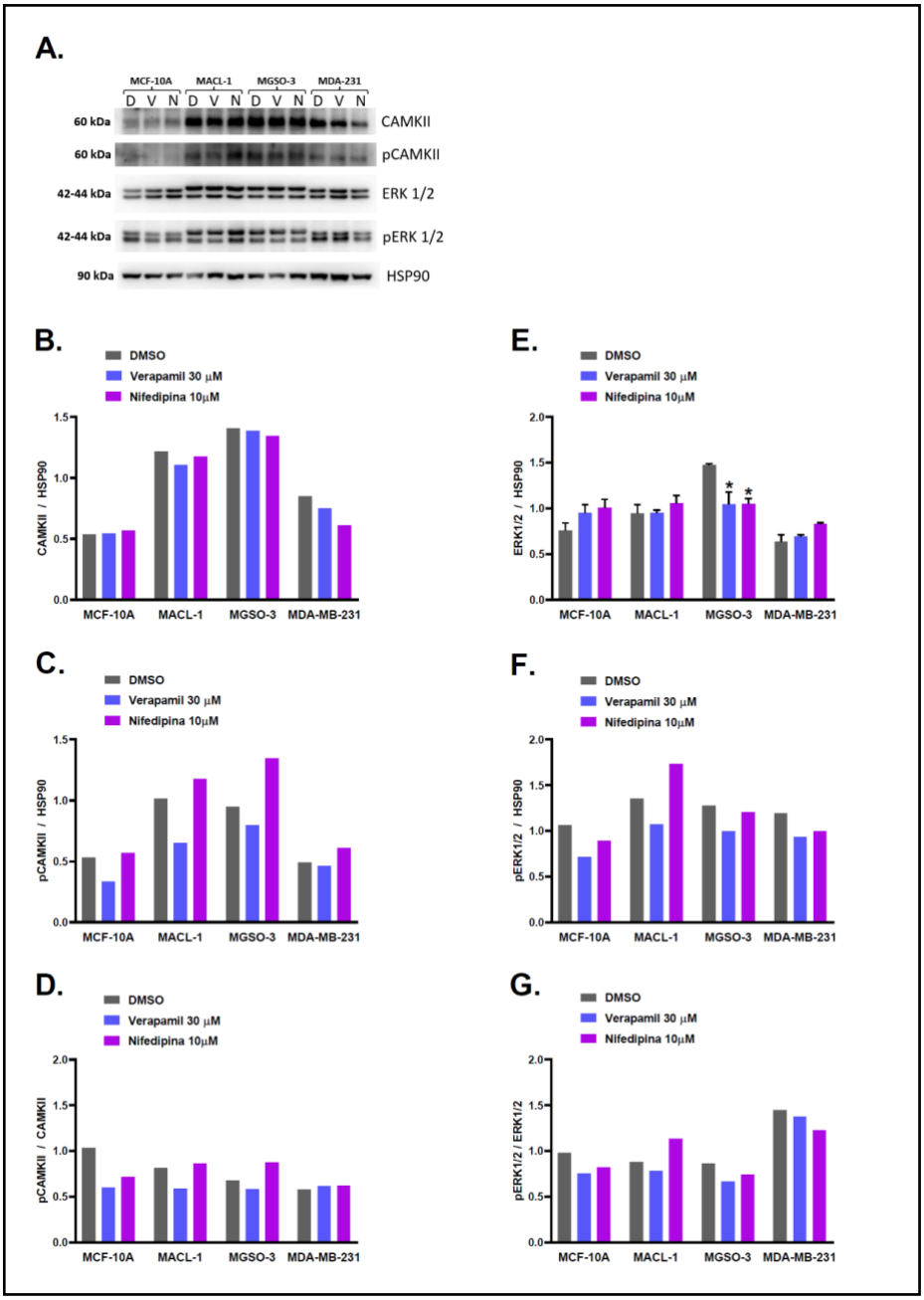

Figura 31 – Expressão de kinases reguladas pela concentração de Ca^{2+}. A. Imagens representativas para a expressão de CAMKII (total e fosforilada) e de ERK1/2 (total e fosforilada) após exposição à 30 µM de verapamil ou 10 µM de nifedipina por 96 h. As amostras foram apresentadas na seguinte ordem: D. DMSO, V. 30 µM verapamil, N. 10 µM nifedipina. B - D. Quantificação da expressão de CAMKII total e fosforilada (n=2). E - G. Quantificação da expressão de ERK1/2 total (n=3) e fosforilada (n=2). HSP90 foi utilizado como normalizador. Os valores estão apresentados como média (Fig. 31 B-D,F,G) e média ± EPM (Fig.31E) e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Bonferroni para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO.

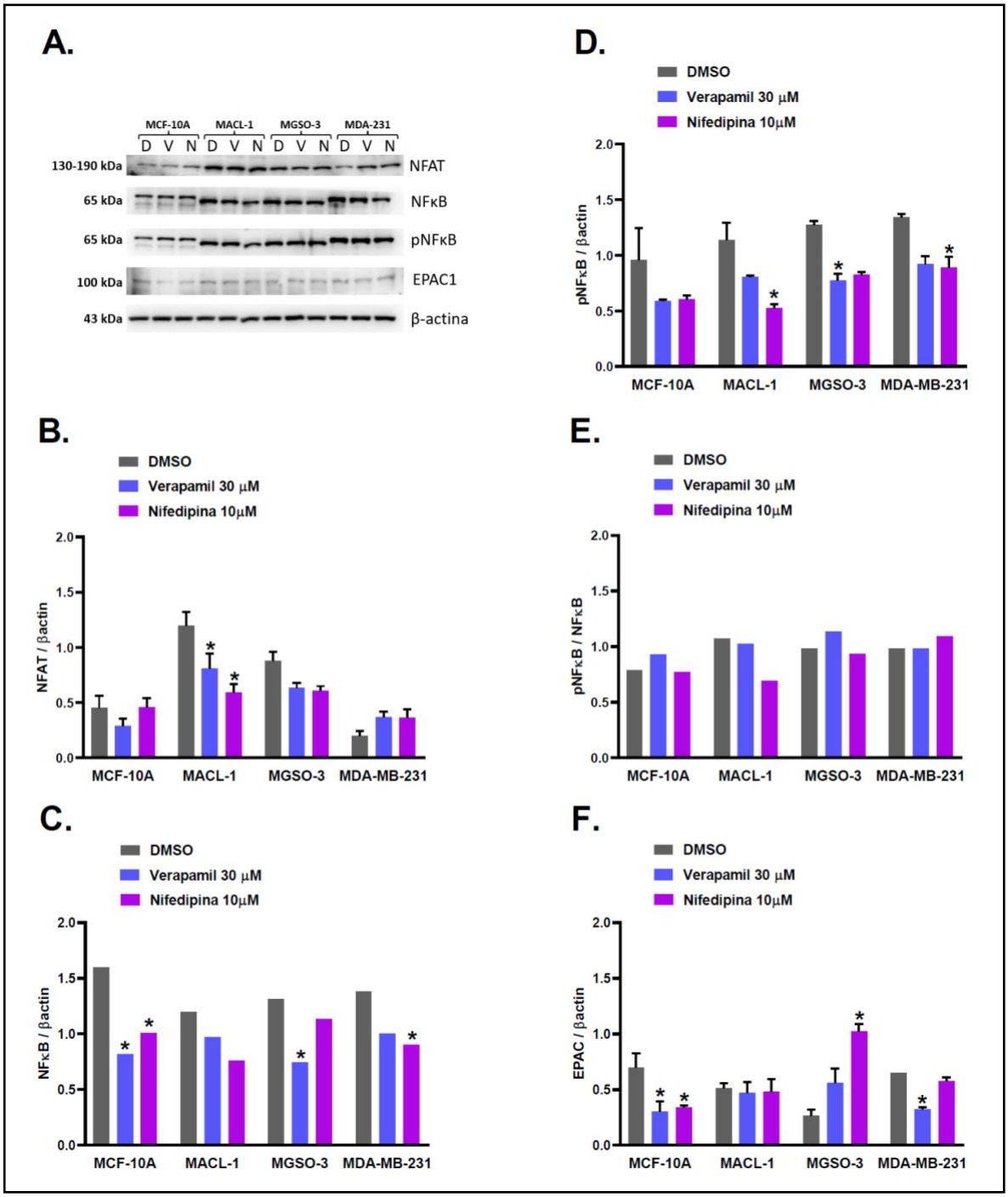

Figura 32 – Expressão de fatores de transcrição e EPAC. A. Imagens representativas para a expressão de NFAT, NFκB (total e fosforilada) e de EPAC1 após exposição à 30 μM de verapamil ou 10 μM de nifedipina por 96 h. As amostras foram apresentadas na seguinte ordem: D. DMSO, V. 30 μM verapamil, N. 10 μM nifedipina. B. Quantificação da expressão de NFAT (n=3). C - E. Quantificação da expressão de NFκB total (n=2) e fosforilada (n=3). F. Quantificação da expressão de EPAC1 (n=3). β-actina foi utilizada como normalizador. Os valores estão apresentados como média (Fig. 32C, E) e média ± EPM (Fig. 32B,D,F) e utilizou-se ANOVA *two-way* para a análise da variância e o teste de Bonferroni para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0.05$. ⁎ vs. DMSO.

5.6 Em resposta a administração de 100 µM de verapamil, células MCF-10A e MDA-MB-231 apresentam um aumento na concentração intracelular de AMPc.

Com o intuito de entender melhor sobre a possível atuação dos BCC na via de sinalização do AMPc, nós utilizamos a ferramenta de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) para avaliar as variações na concentração intracelular desse segundo mensageiro. Primeiro, utilizamos o sensor para AMPc Epac1-camps2 em células não-tumorais (MCF-10A) e tumorais metastáticas (MDA-MB-231). Como é possível observar na **Figura 33**, a administração de 100 µM de verapamil levou a um aumento na concentração intracelular de AMPc em ambas as linhagens analisadas (0,47 ± 0,04 antes e 1,63 ± 0,02 após a administração de verapamil em células MCF-10A, 0,90 ± 0,08 antes e 5,96 ± 0,12 após o fármaco em células MDA-MB-231).

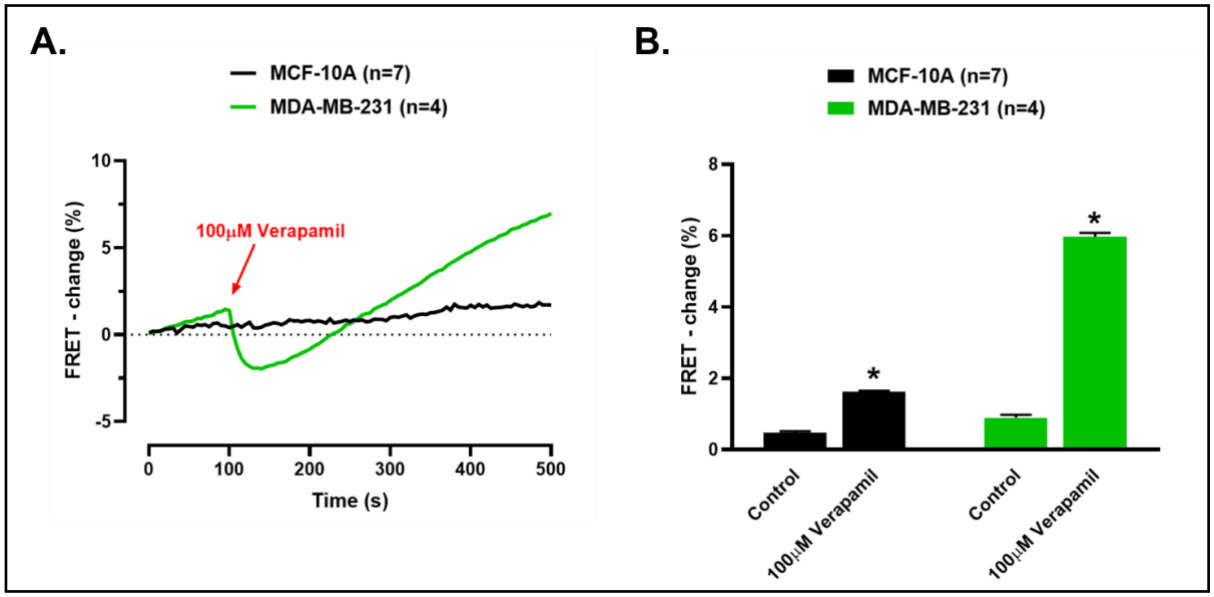

Figura 33 – Efeito do verapamil na concentração intracelular de AMPc. A. Células MCF-10A e MDA-MB-231, transfectadas com o sensor Epac1-camps, foram monitoradas ao longo de 8 minutos em relação a taxa de FRET apresentada pelas mesmas. Seta indica o momento da administração de 100 µM verapamil. B. Valores de FRET antes (control) e após 6 minutos da administração do fármaco. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *one-way* para a análise da variância e o teste de Bonferroni para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0,05$. ⁎ vs. Controle.

Considerando os resultados anteriores, nosso próximo passo foi avaliar a atividade da principal enzima ativada pelo aumento do AMPc, a proteína kinase A (PKA). Para isso, transfectamos as células MCF-10A e MDA-MB-231 com o sensor AKAR4, capaz de monitorar a atividade dessa enzima antes e após a administração do verapamil. Foi possível observar que, apesar do pequeno aumento do AMPc nas células MCF-10A, a atividade da PKA nessas células aumentou consideravelmente após a administração de 100 μM de verapamil (0,24 ± 0,06 antes e 4,52 ± 0,04 após a adição do fármaco) (**Figura 34**). Por outro lado, em células MDA-MB-231, onde o aumento da concentração de AMPc foi mais proeminente, a atividade da PKA aumentou, porém de forma mais discreta em resposta ao BCC (0,10 ± 0,03 antes e 0,29 ± 0,01 após administração do verapamil).

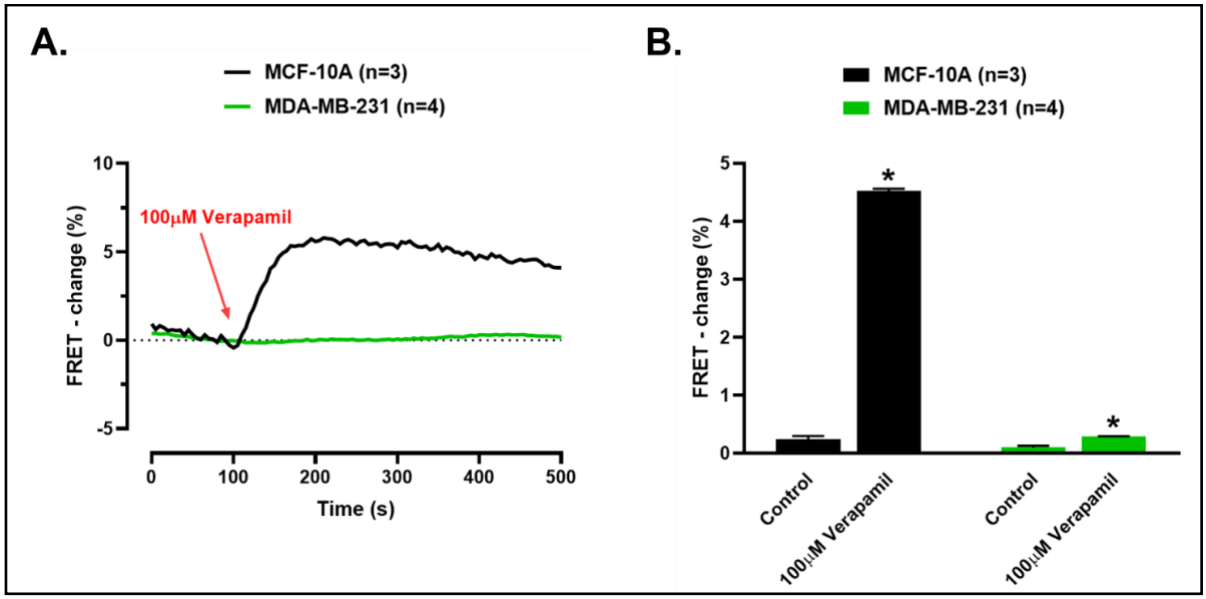

Figura 34 – Efeito do verapamil na atividade da PKA. A. Células MCF-10A e MDA-MB-231, transfectadas com o sensor AKAR4, foram monitoradas ao longo de 8 minutos em relação a taxa de FRET apresentada pelas mesmas. Seta indica o momento da administração de 100 μM verapamil. B. Valores de FRET antes (control) e após 6 minutos da administração do fármaco. Os valores estão apresentados como média ± EPM e utilizou-se ANOVA *one-way* para a análise da variância e o teste de Bonferroni para comparação entre os grupos; considerou-se $p < 0,05$. ⁎ vs. Controle.

DISCUSSÃO

Um resumo de todos os resultados obtidos pode ser encontrado na **Tabela 3**. De maneira geral, podemos dizer que os nossos dados demonstram que os BCC verapamil e nifedipina podem alterar a proliferação celular quando expostos de forma prolongada. Apesar das células analisadas não apresentarem a expressão de VGCC do tipo L e T funcionais, ambos os fármacos parecem alterar a homeostase do íon Ca^{2+} por mecanismos ainda desconhecidos. É possível afirmar que existe uma comunicação entre as vias de sinalização ativadas pelo Ca^{2+} e pelo AMPc como resposta à exposição de células não-tumorais ao verapamil.

Ao contrário do que era esperado, os resultados obtidos para a exposição ao verapamil demonstram que, dependendo da concentração e do tempo de incubação, o fármaco pode atuar aumentando ou diminuindo a proliferação. Em um estudo realizado com células de carcinoma hepático, concentrações de 1 a 500 µM produziram uma redução da proliferação celular a partir de 6 h de exposição (Cao, Niu et al. 2005). Além disso, o uso do verapamil associado à outros quimioterápicos vem ganhando força na clínica médica, uma vez que este bloqueador gerou um aumento na citotoxicidade causada pelo quimioterápico (Wong, Demircioglu et al. 2015, Jaferian, Soleymaninejad et al. 2018) ou mesmo retardar a resistência farmacológica desenvolvida por alguns tumores (Nanayakkara, Follit et al. 2018, Zheng, Li et al. 2018).

Entretanto, o tratamento de modelos murinos para câncer de mama com verapamil não induziu uma redução no tamanho ou no peso dos tumores (Guo, Zhang et al. 2014). É importante ressaltar que tais estudos foram conduzidos em células neoplásicas que apresentam características relacionadas a agressividade tumoral, podendo ainda ser provenientes de sítios metastáticos. Nesse sentido, o nosso trabalho faz o uso de linhagens provenientes de tumores em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral, o que poderia justificar a diferença entre os resultados. Ainda, o nosso estudo apresentou pela primeira vez a ação desses medicamentos em células não-tumorais, o que nos permitiu avaliar uma lacuna ainda existente quanto a compreensão de como os BCC podem atuar no risco de desenvolver câncer de mama.

Já o aumento da proliferação celular causado pela exposição à nifedipina demonstrado pelos nossos resultados estão em concordância com outros trabalhos publicados (Guo, Zhang et al. 2014, Zhao, Guo et al. 2017). Por outro lado, a exposição prolongada de células não-tumorais à baixas doses de BCC ativou mecanismos intracelulares que atuam na proliferação celular, aumentando este processo de forma expressiva. Apesar de estudos *in vitro* buscarem compreender melhor os mecanismos que podem atuar nessa relação, o tratamento com anti-hipertensivos acontece majoritariamente em células tumorais, excluindo das análises as

possíveis alterações de metabolismo, expressão gênica e proteica que pode ocorrer entre células neoplásicas e não-neoplásicas.

De maneira geral, podemos concluir que os resultados obtidos para a proliferação celular demonstram que, apesar dos fármacos testados serem de uma mesma classe farmacológica, os efeitos produzidos pela exposição aos mesmos podem ser diferentes, ressaltando a importância de se avaliar cada fármaco de forma isolada. Uma vez que vários dos estudos observacionais feitos até o momento conduzem suas análises de acordo com a classe farmacológica (Assimes, Elstein et al. 2008, Largent, Bernstein et al. 2010, Bangalore, Kumar et al. 2011, Leung, Hung et al. 2015, Gómez-Acebo, Dierssen-Sotos et al. 2016), além de que vários desses pacientes fazem o uso concomitante de dois ou mais tipos de anti-hipertensivos (Cuspidi, Tadic et al. 2018, Mills, Stefanescu et al. 2020), uma reavaliação da metodologia adotada se faz necessária, uma vez que este pode ser um fator que contribui para a grande variabilidade de resultados encontrados quanto ao uso dos anti-hipertensivos e o risco de desenvolver tumores.

A expressão de canais do tipo L e T em tumores mamários já foi descrita pela literatura, assim como seus efeitos na proliferação e migração celular, na apoptose e até mesmo na transição epitélio-mesênquima (Phan, Wang et al. 2017, Bhargava and Saha 2019, Kanwar, Carmine-Simmen et al. 2020, Pratt, Hernández-Ochoa et al. 2020, Tajada and Villalobos 2020), processo desenvolvido por essas células e importante para a evasão à resposta imune, à morte celular programada e à resistência farmacológica (Chou and Yang 2015). Porém, os resultados encontrados começaram à suscitar diferentes hipóteses que pudessem justificar como os BCC induziram as alterações na proliferação celular observadas, sendo que não é observada nenhuma corrente de influxo.

Uma das hipóteses é a possibilidade de as células expressarem estes canais, porém estes possuem outras funções que não estão relacionadas com a permeabilidade iônica. Essa é uma linha de pesquisa que tem ganhado força nos últimos anos, principalmente no que diz respeito a expressão de canais dependentes de voltagem em células tumorais (Davenport, Li et al. 2015, Jacquemet, Baghirov et al. 2016, Kruger and Isom 2016, Phan, Wang et al. 2017, Dolphin 2018, Pratt, Hernández-Ochoa et al. 2020). Em um estudo realizado com câncer colorretal, apesar da expressão de canais $Ca_v1.3$ estar presente em tecidos provenientes de biopsias e em células de cultivo, correntes de influxo produzidas por estes canais não foram visualizadas. Não somente, o bloqueio e/ou o silenciamento destes canais reduziu a $[Ca^{2+}]_{IC}$ e a migração celular (Fourbon, Guéguinou et al. 2017).

Linhagem Celular	BCC	Técnica				
		MTT*	Azul de Trypan*	*Patch-clamp*	Microscopia Confocal	*Western-Blot*	FRET
MCF-10A	Verapamil	↑ Proliferação (10/30 μM)	↓ Proliferação (100 μM)	Ausência de ICa_L e ICa_T.	A: sem alteração. P: ↑ $[Ca^{2+}]$ (30/100 μM)	↓ NFκB, EPAC	↑ [AMPc] ↑ Ativ. PKA
	Nifedipina	↑ Proliferação (1/3/10 μM)	↑ Proliferação (3/10 μM)		A: ↓ $[Ca^{2+}]$ (3/10 μM) P: ↑ $[Ca^{2+}]$ (10 μM)	↓ NFκB, EPAC	-
MACL-1	Verapamil	↑ Proliferação (10/30 μM) ↓ Proliferação (100 μM)	↓ Proliferação (100 μM)	Ausência de ICa_L e ICa_T.	A: sem alteração. P: ↓ $[Ca^{2+}]$ (100 μM)	↓ NFAT	-
	Nifedipina	↑ Proliferação (1/3/10 μM)	↑ Proliferação (3/10 μM)		A: ↑ $[Ca^{2+}]$ (3/10 μM) P: ↓ $[Ca^{2+}]$ (3/10 μM)	↓ NFAT, pNFκB	-
MGSO-3	Verapamil	↓ Proliferação (100 μM)	↓ Proliferação (30/100 μM)	Ausência de ICa_L e ICa_T.	A: ↓ $[Ca^{2+}]$ (100 μM) P: ↑ $[Ca^{2+}]$ (30/100 μM)	↓ ERK1/2, NFκB, pNFκB	-
	Nifedipina	↑ Proliferação (1/3 μM)	↑ Proliferação (3/10 μM)		A: ↓ $[Ca^{2+}]$ (3 μM) ↑ $[Ca^{2+}]$ (100 μM) P: sem alteração.	↑ EPAC ↓ ERK1/2	-
MDA-MB-231	Verapamil	↓ Proliferação (100 μM)	↑ Proliferação (30 μM) ↓ Proliferação (100 μM)	Ausência de ICa_L e ICa_T.	A: ↑ $[Ca^{2+}]$ (30 μM) P: ↑ $[Ca^{2+}]$ (100 μM)	↓ EPAC	↑ [AMPc] ↑ Ativ. PKA
	Nifedipina	↑ Proliferação (1/3/10 μM)	↑ Proliferação (3/10 μM)		A: sem alteração. P: ↓ $[Ca^{2+}]$ (3 μM)	↓ NFκB, pNFκB	-

Tabela 3 – Resumo geral dos resultados. BCC, Bloqueadores de canais de Ca^{2+}. ICa_L, Corrente de Ca^{2+} do tipo L. ICa_T, Corrente de Ca^{2+} do tipo T. A, Exposição aguda. P, Exposição prolongada (96 horas). $[Ca^{2+}]$, Concentração intracelular de Ca^{2+}. [AMPc], Concentração intracelular de AMP cíclico. PKA_{act}, Atividade da enzima PKA. *Os resultados apresentados na tabela foram obtidos após 96 horas de incubação com o fármaco em questão.

De forma similar, os nossos resultados demonstraram a expressão de canais $Ca_v1.2$ e TRPC6 em células tumorais e/ou não-tumorais, mesmo na ausência de correntes de influxo produzidas pelo canal dependente de voltagem do tipo L. Entretanto, a exposição prolongada ao verapamil e a nifedipina não demonstraram alterar a expressão desses canais em nenhuma das células analisadas, o que poderia indicar a não participação desses canais na sinalização ativada por esses fármacos. Curiosamente, durante a realização dos experimentos de *western-blot*, foi possível observar que o *immunoblotting* para estes canais se mostrava bastante "inespecífico", mas apenas para as células tumorais. Tal "inespecificidade" de marcação não foi atribuída a baixa qualidade do anticorpo, mas sim a presença de *splicings* alternativos e de formas truncadas desses canais, como já foi descrito anteriormente (Pitt, Matsui et al. 2021).

Outra hipótese que pode ser levantada é a ligação desses fármacos à outras estruturas celulares e, assim, regular a concentração intracelular de Ca^{2+}. Nesse sentido, já foi observado que a nifedipina pode atuar bloqueando um canal catiônico não-seletivo na reposição dos estoques de Ca^{2+} intracelular no músculo liso (Curtis and Scholfield 2001) ou em canais do tipo TRPM3 (Samanta, Hughes et al. 2018). Outro estudo também demonstrou que diferentes tipos de BCC eram capazes de aumentar a $[Ca^{2+}]_{IC}$ a partir da ativação de proteínas STIM (*stromal-interacting molecule)* e, consequentemente, de canais ORAI, para promover o remodelamento vascular (Johnson, Gudlur et al. 2020).

VGCC são responsáveis por quase toda a entrada de íons Ca^{2+} no ambiente intracelular em células excitáveis. Porém, em células não-excitáveis, incluindo células tumorais, esse transporte fica a cargo de canais de Ca^{2+} do tipo *store-operated,* como os canais ORAI. Estes canais estão presentes na membrana celular e são ativados em situações em que há a redução dos estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. A expressão de canais ORAI em células tumorais já foi associada a regulação de diferentes processos celulares, como proliferação, migração e resistência a apoptose (Prevarskaya, Skryma et al. 2018, Tajada and Villalobos 2020). Dessa forma, a interação dos BCC, verapamil e nifedipina, com outros canais iônicos permeáveis ao Ca^{2+} se torna uma explicação plausível para as variações na concentração intracelular desse íon observada nesse estudo.

No que diz respeito a $[Ca^{2+}]_{IC}$, nossos dados demonstraram que células tumorais metastáticas apresentam uma quantidade elevada de Ca^{2+} em seu espaço intracelular, quando comparada com células não-tumorais ou tumorais provenientes de sítios não-metastáticos. Esse achado vai de encontro com outros trabalhos que demonstraram que células tumorais

apresentam uma $[Ca^{2+}]_{IC}$ aumentada, a fim de favorecer a ativação de vias que desenvolvem um perfil celular cada vez mais agressivo (Humeau, Bravo-San Pedro et al. 2018).

Outra observação feita a partir dos dados coletados é que o uso prolongado de 100 μM de verapamil aumentou a $[Ca^{2+}]_{IC}$ em diferentes tipos de células tumorais. Estes dados vão de encontro com outro trabalho já publicado e que avaliou o papel do verapamil na proliferação de células de câncer de fígado (Cao et al., 2005). Grande parte dos trabalhos que avaliam o papel do verapamil em células tumorais é voltado para sua capacidade citotóxica e de inibição da glicoproteína-P, importante para a resistência farmacológica. Pensando que um aumento exacerbado do Ca^{2+} intracelular pode ser prejudicial à célula e, consequentemente, induzir a ativação da apoptose ou paralisar o ciclo celular (Humeau, Bravo-San Pedro et al. 2018), este poderia ser apontado como um dos mecanismos pelo o qual o uso do verapamil em conjunto com outros quimioterápicos pode auxiliar no tratamento de pacientes oncológicos.

Por outro lado, a administração prolongada de 10 μM nifedipina reduziu ou não alterou a concentração de Ca^{2+} em células tumorais, indicando que o aumento da proliferação observado em ambos os ensaios de proliferação está associado a uma via de sinalização independentes de Ca^{2+}. Em um estudo realizado com células MDA-MB-231, os autores relatam um aumento da proliferação celular quando estas células eram tratadas com nifedipina e que essa resposta não estava associada ao
Ca^{2+}, além de ter aumentado a fosforilação de ERK (Guo, Zhang et al. 2014). Quando as mesmas análises foram feitas em células MCF-7, o resultado também apontou para uma resposta Ca^{2+}-independente, porém com um aumento na expressão de AKT-eNOS (Zhao, Guo et al. 2017). Nesse sentido, uma melhor investigação dessas duas vias de sinalização surge como um possível mecanismo capaz de explicar os resultados que obtivemos nesse estudo para células tumorais.

Células não-tumorais MCF-10A, por outro lado, apresentaram um aumento na $[Ca^{2+}]_{IC}$ em resposta a exposição prolongada ao verapamil e também a nifedipina, que poderia justificar o aumento na proliferação celular. Considerando que os BCC atuam em VGCC e que estas células não apresentam a expressão desses canais, nossa pesquisa parece trazer pela primeira vez o papel desses BCC na proliferação ou mesmo na regulação da homeostase do Ca^{2+} intracelular em células não-tumorais de mama. Dessa forma, buscamos avaliar quais as vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} poderiam estar por detrás dos resultados encontrados. O que percebemos foi que a expressão de NFκB e de EPAC estava reduzida na presença de ambos bloqueadores.

NFκB é uma família composta por 5 fatores de transcrição capazes de regular a expressão de diversos genes, com atuação na inflamação, imunidade, proliferação e morte celular. Podendo ser regulado pelos mais diferentes estímulos, muitos consideram estes fatores de transcrição reguladores da homeostase celular. No câncer, a ativação desses fatores de transcrição já foi descrita em vários tipos de tumores, incluindo o de mama, e foi associada com a resistência aos sinais de morte celular, regulação da angiogênese, aumento da capacidade de proliferação e migração, entre outros (Wang, Nag et al. 2015, Xia, Tan et al. 2018, Zinatizadeh, Schock et al. 2021). Considerando que a fosforilação de NFκB pode aumentar drasticamente a sua atividade transcricional (Zhong, SuYang et al. 1997, Tak and Firestein 2001), podemos concluir que apesar de nossos dados apontarem para uma redução na expressão de NFκB total, a atividade de sua forma ativa (ou seja, fosforilada) foi mantida a mesma.

Por outro lado, a incubação prolongada com verapamil e nifedipina reduziu a expressão da proteína EPAC, indicando uma possível comunicação entre as vias de sinalização do Ca^{2+} e do AMPc. Não somente, a administração de 100 μM de verapamil aumentou a concentração de AMPc e a atividade da enzima PKA. O AMPc, assim como o Ca^{2+}, é um sinalizador intracelular com ações bastante diversas, que vão desde expressão gênica, metabolismo até a liberação de neurotransmissores. Em células tumorais, o aumento da concentração intracelular de AMPc e, consequentemente, da ativação de seus principais alvos (PKA e EPAC) foi associado a capacidade de proliferação e migração, a resistência farmacológica e ao processo de transição epitélio-mesênquima (Dong, Claffey et al. 2015, Sapio, Gallo et al. 2017, Zhang, Kong et al. 2020). Não encontramos estudos que avaliassem a atuação de BCC na via de sinalização mediada pelo AMPc, podendo ser a primeira vez que essa associação esteja sendo descrita.

Dessa forma, podemos concluir que o aumento na proliferação celular observado após a exposição prolongada ao verapamil e nifedipina em células não-tumorais está associado a sinalização intracelular mediada pelo Ca^{2+}, podendo sim ser considerado como um fator de risco para o desenvolvimento de tumores de mama. De forma mais específica, o mecanismo de ação pelo qual o verapamil atua nesse processo celular apresenta-se com uma comunicação entre dois dos principais sinalizadores intracelulares: o AMPc e o Ca^{2+}.

CONCLUSÃO

Com base no que foi apresentado e discutido acima, podemos concluir que a administração prolongada dos fármacos verapamil e nifedipina foi capaz de alterar a proliferação de células tumorais, mas principalmente, de células não-tumorais de mama, mesmo apresentando uma ausência de correntes macroscópicas de influxo. Ainda, a concentração intracelular de Ca^{2+}, um importante mensageiro para a regulação dos mais diversos processos celulares, mostrou-se aumentada em células não-tumorais após a exposição prolongada à ambos os medicamentos. Apesar de ainda desconhecido, o mecanismo pelo qual estes bloqueadores atuam nestas células parece estar associado à via de sinalização intracelular regulada pelo AMPc. Assim, este trabalho traz novas evidências acerca da possível atuação de bloqueadores de canais de Ca^{2+} como fatores de risco para o desenvolvimento tumoral, mais especificamente, daqueles que se localizam na mama. Por fim, novos estudos se fazem necessários para desvendar o mecanismo por detrás dessa associação, principalmente buscando a comunicação entre as vias de sinalização coordenadas pelo Ca^{2+} e pelo AMPc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcover, A., M. J. Weiss, J. F. Daley and E. L. Reinherz (1986). "The T11 glycoprotein is functionally linked to a calcium channel in precursor and mature T-lineage cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(8): 2614-2618.

Alex, A., E. Bhandary and K. P. McGuire (2020). "Anatomy and Physiology of the Breast during Pregnancy and Lactation." Adv Exp Med Biol **1252**: 3-7.

Alexander, S. P. H., A. Mathie, J. A. Peters, E. L. Veale, J. Striessnig, E. Kelly, J. F. Armstrong, E. Faccenda, S. D. Harding, A. J. Pawson, J. L. Sharman, C. Southan, J. A. Davies and C. Collaborators. (2019). "The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. ." Br J Pharmacol. **176**(S1): S142-228.

Allison, K. H. (2012). "Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know." Am J Clin Pathol **138**(6): 770-780.

Amunjela, J. N. and S. J. Tucker (2017). "Dysregulation of POPDC1 promotes breast cancer cell migration and proliferation." Biosci Rep **37**(6).

Arcangeli, A. and A. Becchetti (2015). "Novel perspectives in cancer therapy: Targeting ion channels." Drug Resist Updat **21-22**: 11-19.

Assimes, T. L., E. Elstein, A. Langleben and S. Suissa (2008). "Long-term use of antihypertensive drugs and risk of cancer." Pharmacoepidemiol Drug Saf **17**(11): 1039-1049.

Azimi, I. and G. R. Monteith (2016). "Plasma membrane ion channels and epithelial to mesenchymal transition in cancer cells." Endocr Relat Cancer **23**(11): R517-r525.

Bagur, R. and G. Hajnóczky (2017). "Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling." Mol Cell **66**(6): 780-788.

Bangalore, S., S. Kumar, S. E. Kjeldsen, H. Makani, E. Grossman, J. Wetterslev, A. K. Gupta, P. S. Sever, C. Gluud and F. H. Messerli (2011). "Antihypertensive drugs and risk of cancer: network meta-analyses and trial sequential analyses of 324,168 participants from randomised trials." Lancet Oncol **12**(1): 65-82.

Bergantin, L. B. (2019). "Diabetes and cancer: Debating the link through Ca(2+)/cAMP signalling." Cancer Lett **448**: 128-131.

Bergantin, L. B. (2020). "Depression Rises the Risk of Hypertension Incidence: Discussing the Link through the Ca2+/cAMP Signalling." Curr Hypertens Rev **16**(1): 73-78.

Berridge, M. J. (1997). "Elementary and global aspects of calcium signalling." J Physiol **499 (Pt 2)**(Pt 2): 291-306.

Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.

Bers, D. M., Y. K. Xiang and M. Zaccolo (2019). "Whole-Cell cAMP and PKA Activity are Epiphenomena, Nanodomain Signaling Matters." Physiology (Bethesda) **34**(4): 240-249.

Bhargava, A. and S. Saha (2019). "T-Type voltage gated calcium channels: a target in breast cancer?" Breast Cancer Res Treat **173**(1): 11-21.

Bong, A. H. L. and G. R. Monteith (2018). "Calcium signaling and the therapeutic targeting of cancer cells." Biochim Biophys Acta Mol Cell Res **1865**(11 Pt B): 1786-1794.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." **68**(6): 394-424.

Busby, J., L. Murray, K. Mills, S. D. Zhang, F. Liberante and C. R. Cardwell (2018). "A combined connectivity mapping and pharmacoepidemiology approach to identify existing medications with breast cancer causing or preventing properties." Pharmacoepidemiol Drug Saf **27**(1): 78-86.

Cao, Q. Z., G. Niu and H. R. Tan (2005). "In vitro growth inhibition of human colonic tumor cells by Verapamil." World J Gastroenterol **11**(15): 2255-2259.

Carafoli, E. and J. Krebs (2016). "Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator." J Biol Chem **291**(40): 20849-20857.

Caricati-Neto, A., A. G. García and L. B. Bergantin (2015). "Pharmacological implications of the Ca(2+)/cAMP signaling interaction: from risk for antihypertensive therapy to potential beneficial for neurological and psychiatric disorders." Pharmacol Res Perspect **3**(5): e00181.

Catterall, W. A. (2011). "Voltage-gated calcium channels." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(8): a003947.

Catterall, W. A., M. J. Lenaeus and T. M. Gamal El-Din (2020). "Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels." Annu Rev Pharmacol Toxicol **60**: 133-154.

Catterall, W. A., J. Striessnig, T. P. Snutch and E. Perez-Reyes (2003). "International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels." Pharmacol Rev **55**(4): 579-581.

Catterall, W. A. and T. M. Swanson (2015). "Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels." Mol Pharmacol **88**(1): 141-150.

Chambers, A. F., A. C. Groom and I. C. MacDonald (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**(8): 563-572.

Chen, L., J. Chubak, D. M. Boudreau, W. E. Barlow, N. S. Weiss and C. I. Li (2017). "Use of Antihypertensive Medications and Risk of Adverse Breast Cancer Outcomes in a SEER-Medicare Population." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **26**(11): 1603-1610.

Cheng, H., W. J. Lederer and M. B. Cannell (1993). "Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle." Science **262**(5134): 740-744.

Chesnoy-Marchais, D. and J. Fritsch (1988). "Voltage-gated sodium and calcium currents in rat osteoblasts." J Physiol **398**: 291-311.

Chou, Y.-S. and M.-H. Yang (2015). "Epithelial–mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy." Journal of the Chinese Medical Association **78**(8): 438-445.

Chow, L. W., K. S. Cheng, K. L. Wong and Y. M. Leung (2018). "Voltage-gated K(+) channels promote BT-474 breast cancer cell migration." Chin J Cancer Res **30**(6): 613-622.

Collins, L. C. (2018). "Precursor Lesions of the Low-Grade Breast Neoplasia Pathway." Surg Pathol Clin **11**(1): 177-197.

Correa, C. R., C. M. Bertollo and A. M. Goes (2009). "Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer." Oncol Res **17**(10): 473-482.

Curtis, T. M. and C. N. Scholfield (2001). "Nifedipine blocks Ca2+ store refilling through a pathway not involving L-type Ca2+ channels in rabbit arteriolar smooth muscle." J Physiol **532**(Pt 3): 609-623.

Cuspidi, C., M. Tadic, G. Grassi and G. Mancia (2018). "Treatment of hypertension: The ESH/ESC guidelines recommendations." Pharmacol Res **128**: 315-321.

D'Agostino, G., A. Saporito, V. Cecchinato, Y. Silvestri, A. Borgeat, L. Anselmi and M. Uguccioni (2018). "Lidocaine inhibits cytoskeletal remodelling and human breast cancer cell migration." Br J Anaesth **121**(4): 962-968.

Dai, X., L. Xiang, T. Li and Z. Bai (2016). "Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes." J Cancer **7**(10): 1281-1294.

Daling, J. R. (1996). "Calcium channel blockers and cancer: is an association biologically plausible?" Am J Hypertens **9**(7): 713-714.

Davenport, B., Y. Li, J. W. Heizer, C. Schmitz and A. L. Perraud (2015). "Signature Channels of Excitability no More: L-Type Channels in Immune Cells." Front Immunol **6**: 375.

Day, C. M., S. M. Hickey, Y. Song, S. E. Plush and S. Garg (2020). "Novel Tamoxifen Nanoformulations for Improving Breast Cancer Treatment: Old Wine in New Bottles." Molecules **25**(5).

Dewenter, M., A. von der Lieth, H. A. Katus and J. Backs (2017). "Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes." Circ Res **121**(8): 1000-1020.

Dolphin, A. C. (2016). "Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology." J Physiol **594**(19): 5369-5390.

Dolphin, A. C. (2018). "Voltage-gated calcium channel α (2)δ subunits: an assessment of proposed novel roles." F1000Res **7**.

Dolphin, A. C. (2018). "Voltage-gated calcium channels: their discovery, function and importance as drug targets." Brain Neurosci Adv **2**.

Dong, H., K. P. Claffey, S. Brocke and P. M. Epstein (2015). "Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling." Breast Cancer Res Treat **152**(1): 17-28.

Dupont, G., G. Houart and P. De Koninck (2003). "Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca2+ oscillations: a simple model." Cell Calcium **34**(6): 485-497.

Emens, L. A. (2018). "Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes." Clin Cancer Res **24**(3): 511-520.

Ferlay, J. E., M; Lam, F; Colombet, M; Mery, L; Piñeros, M; et al. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today.

Figueroa, J. D., G. L. Gierach, M. A. Duggan, S. Fan, R. M. Pfeiffer, Y. Wang, R. T. Falk, O. Loudig, M. Abubakar, M. Ginsberg, T. M. Kimes, K. Richert-Boe, A. G. Glass and T. E. Rohan (2021). "Risk factors for breast cancer development by tumor characteristics among women with benign breast disease." Breast Cancer Res **23**(1): 34.

Fitzpatrick, A. L., J. R. Daling, C. D. Furberg, R. A. Kronmal and J. L. Weissfeld (1997). "Use of calcium channel blockers and breast carcinoma risk in postmenopausal women." Cancer **80**(8): 1438-1447.

Fourbon, Y., M. Guéguinou, R. Félix, B. Constantin, A. Uguen, G. Fromont, L. Lajoie, C. Magaud, T. Lecomte, E. Chamorey, A. Chatelier, O. Mignen, M. Potier-Cartereau, A. Chantôme, P. Bois and C. Vandier (2017). "Ca(2+) protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity." Scientific reports **7**(1): 14199-14199.

Gandini, S., D. Palli, G. Spadola, B. Bendinelli, E. Cocorocchio, I. Stanganelli, L. Miligi, G. Masala and S. Caini (2018). "Anti-hypertensive drugs and skin cancer risk: a review of the literature and meta-analysis." Crit Rev Oncol Hematol **122**: 1-9.

Giancotti, F. G. (2014). "Deregulation of cell signaling in cancer." FEBS Lett **588**(16): 2558-2570.

Giess, C. S., E. P. Frost and R. L. Birdwell (2012). "Difficulties and errors in diagnosis of breast neoplasms." Semin Ultrasound CT MR **33**(4): 288-299.

Going, J. J. (2003). "Stages on the way to breast cancer." J Pathol **199**(1): 1-3.

Gómez-Acebo, I., T. Dierssen-Sotos, C. Palazuelos, B. Pérez-Gómez, V. Lope, I. Tusquets, M. H. Alonso, V. Moreno, P. Amiano, A. J. Molina de la Torre, A. Barricarte, A. Tardon, A. Camacho, R. Peiro-Perez, R. Marcos-Gragera, M. Muñoz, M. J. Michelena-Echeveste, L. Ortega Valin, M. Guevara, G. Castaño-Vinyals, N. Aragonés, M. Kogevinas, M. Pollán and J. Llorca (2016). "The Use of Antihypertensive Medication and the Risk of Breast Cancer in a Case-Control Study in a Spanish Population: The MCC-Spain Study." PLOS ONE **11**(8): e0159672.

Grimaldi-Bensouda, L., O. Klungel, X. Kurz, M. C. de Groot, A. S. Maciel Afonso, M. L. de Bruin, R. Reynolds and M. Rossignol (2016). "Calcium channel blockers and cancer: a risk analysis using the UK Clinical Practice Research Datalink (CPRD)." BMJ Open **6**(1): e009147.

Guan, X. (2015). "Cancer metastases: challenges and opportunities." Acta Pharm Sin B **5**(5): 402-418.

Guo, D. Q., H. Zhang, S. J. Tan and Y. C. Gu (2014). "Nifedipine promotes the proliferation and migration of breast cancer cells." PLoS One **9**(12): e113649.

Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hartmann, L. C., D. C. Radisky, M. H. Frost, R. J. Santen, R. A. Vierkant, L. L. Benetti, Y. Tarabishy, K. Ghosh, D. W. Visscher and A. C. Degnim (2014). "Understanding the premalignant potential of atypical hyperplasia through its natural history: a longitudinal cohort study." Cancer Prev Res (Phila) **7**(2): 211-217.

Hassiotou, F. and D. Geddes (2013). "Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge." Clin Anat **26**(1): 29-48.

Heinonen, O. P., S. Shapiro, L. Tuominen and M. I. Turunen (1974). "Reserpine use in relation to breast cancer." Lancet **2**(7882): 675-677.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." J Physiol **117**(4): 500-544.

Hofer, A. M. (2012). "Interactions between calcium and cAMP signaling." Curr Med Chem **19**(34): 5768-5773.

Holmes, S., E. J. Griffith, G. Musto and G. Y. Minuk (2013). "Antihypertensive medications and survival in patients with cancer: a population-based retrospective cohort study." Cancer Epidemiol **37**(6): 881-885.

Humeau, J., J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, L. Nuñez, C. Villalobos, G. Kroemer and L. Senovilla (2018). "Calcium signaling and cell cycle: Progression or death." Cell Calcium **70**: 3-15.

INCA, I. N. d. C. (2020). Estatísticas do Câncer. C. d. P. e. Vigilância. https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer.

Jacquemet, G., H. Baghirov, M. Georgiadou, H. Sihto, E. Peuhu, P. Cettour-Janet, T. He, M. Perälä, P. Kronqvist, H. Joensuu and J. Ivaska (2016). "L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling." Nature communications **7**: 13297-13297.

Jafari, S. H., Z. Saadatpour, A. Salmaninejad, F. Momeni, M. Mokhtari, J. S. Nahand, M. Rahmati, H. Mirzaei and M. Kianmehr (2018). "Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers." J Cell Physiol **233**(7): 5200-5213.

Jaferian, S., M. Soleymaninejad and H. Daraee (2018). "Verapamil (VER) Enhances the Cytotoxic Effects of Docetaxel and Vinblastine Combined Therapy Against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines." Drug Res (Stuttg) **68**(3): 146-152.

Jemal, A., P. Vineis, F. Bray, L. Torre and D. Forman (2014). The cancer atlas, American Cancer Society.

Jiang, M., Y. Yan, K. Yang, Z. Liu, J. Qi, H. Zhou, N. Qian, Q. Zhou, T. Wang, X. Xu, X. Xiao and L. Deng (2019). "Small molecule nAS-E targeting cAMP response element binding protein (CREB) and CREB-binding protein interaction inhibits breast cancer bone metastasis." J Cell Mol Med **23**(2): 1224-1234.

Johansson, J. K., V. I. Karema-Jokinen, S. Hakanen, A. Jylhä, H. Uusitalo, M. Vihinen-Ranta, H. Skottman, T. O. Ihalainen and S. Nymark (2019). "Sodium channels enable fast electrical signaling and regulate phagocytosis in the retinal pigment epithelium." BMC Biol **17**(1): 63.

Johnson, M. T., A. Gudlur, X. Zhang, P. Xin, S. M. Emrich, R. E. Yoast, R. Courjaret, R. M. Nwokonko, W. Li, N. Hempel, K. Machaca, D. L. Gill, P. G. Hogan and M. Trebak (2020). "L-type Ca(2+) channel blockers promote vascular remodeling through activation of STIM proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **117**(29): 17369-17380.

Kaestner, L., X. Wang, L. Hertz and I. Bernhardt (2018). "Voltage-Activated Ion Channels in Non-excitable Cells-A Viewpoint Regarding Their Physiological Justification." Front Physiol **9**: 450.

Kanwar, N., K. Carmine-Simmen, R. Nair, C. Wang, S. Moghadas-Jafari, H. Blaser, D. Tran-Thanh, D. Wang, P. Wang, J. Wang, A. Pasculescu, A. Datti, T. Mak, J. D. Lewis and S. J. Done (2020). "Amplification of a calcium channel subunit CACNG4 increases breast cancer metastasis." EBioMedicine **52**: 102646-102646.

Kaplan, N. M. (1996). "Do calcium antagonists cause death, gastrointestinal bleeding, and cancer?" Am J Cardiol **78**(8): 932-933.

Kiriyama, A., A. Honbo, A. Nishimura, N. Shibata and K. Iga (2016). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses of antihypertensive drugs, nifedipine and propranolol, in spontaneously hypertensive rats to investigate characteristics of effect and side effects." Regul Toxicol Pharmacol **76**: 21-29.

Koschinski, A. and M. Zaccolo (2017). "Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling." Scientific Reports **7**(1): 14090.

Kruger, L. C. and L. L. Isom (2016). "Voltage-Gated Na+ Channels: Not Just for Conduction." Cold Spring Harb Perspect Biol **8**(6).

Largent, J. A., L. Bernstein, P. L. Horn-Ross, S. F. Marshall, S. Neuhausen, P. Reynolds, G. Ursin, J. A. Zell, A. Ziogas and H. Anton-Culver (2010). "Hypertension, antihypertensive medication use, and breast cancer risk in the California Teachers Study cohort." Cancer Causes Control **21**(10): 1615-1624.

Laude, A. J. and A. W. Simpson (2009). "Compartmentalized signalling: Ca2+ compartments, microdomains and the many facets of Ca2+ signalling." Febs j **276**(7): 1800-1816.

Laurent, S. (2017). "Antihypertensive drugs." Pharmacol Res **124**: 116-125.

Lee, J. H., J. W. Park, J. K. Byun, H. K. Kim, P. D. Ryu, S. Y. Lee and D. Y. Kim (2015). "Silencing of voltage-gated potassium channel KV9.3 inhibits proliferation in human colon and lung carcinoma cells." Oncotarget **6**(10): 8132-8143.

Leung, H. W., L. L. Hung, A. L. Chan and C. H. Mou (2015). "Long-Term Use of Antihypertensive Agents and Risk of Breast Cancer: A Population-Based Case-Control Study." Cardiol Ther **4**(1): 65-76.

Li, C. I., J. R. Daling, M. T. Tang, K. L. Haugen, P. L. Porter and K. E. Malone (2013). "Use of antihypertensive medications and breast cancer risk among women aged 55 to 74 years." JAMA Intern Med **173**(17): 1629-1637.

Li, C. I., K. E. Malone, N. S. Weiss, D. M. Boudreau, K. L. Cushing-Haugen and J. R. Daling (2003). "Relation between use of antihypertensive medications and risk of breast carcinoma among women ages 65-79 years." Cancer **98**(7): 1504-1513.

Lipp, P. and E. Niggli (1996). "A hierarchical concept of cellular and subcellular Ca(2+)-signalling." Prog Biophys Mol Biol **65**(3): 265-296.

Lipp, P., D. Thomas, M. J. Berridge and M. D. Bootman (1997). "Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs." Embo j **16**(23): 7166-7173.

Lopez-Garcia, M. A., F. C. Geyer, M. Lacroix-Triki, C. Marchió and J. S. Reis-Filho (2010). "Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways." Histopathology **57**(2): 171-192.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Majeed, W., B. Aslam, I. Javed, T. Khaliq, F. Muhammad, A. Ali and A. Raza (2014). "Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment." Asian Pac J Cancer Prev **15**(8): 3353-3358.

Makki, J. (2015). "Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance." Clin Med Insights Pathol **8**: 23-31.

Marchant, D. J. (1982). "Epidemiology of breast cancer." Clin Obstet Gynecol **25**(2): 387-392.

Mavaddat, N., S. Peock, D. Frost, S. Ellis, R. Platte, E. Fineberg, D. G. Evans, L. Izatt, R. A. Eeles, J. Adlard, R. Davidson, D. Eccles, T. Cole, J. Cook, C. Brewer, M. Tischkowitz, F. Douglas, S. Hodgson, L. Walker, M. E. Porteous, P. J. Morrison, L. E. Side, M. J. Kennedy, C. Houghton, A. Donaldson, M. T. Rogers, H. Dorkins, Z. Miedzybrodzka, H. Gregory, J. Eason, J. Barwell, E. McCann, A. Murray, A. C. Antoniou and D. F. Easton (2013). "Cancer risks for

BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE." J Natl Cancer Inst **105**(11): 812-822.

Menes, T. S., K. Kerlikowske, J. Lange, S. Jaffer, R. Rosenberg and D. L. Miglioretti (2017). "Subsequent Breast Cancer Risk Following Diagnosis of Atypical Ductal Hyperplasia on Needle Biopsy." JAMA Oncol **3**(1): 36-41.

Mills, K. T., A. Stefanescu and J. He (2020). "The global epidemiology of hypertension." Nat Rev Nephrol **16**(4): 223-237.

Mintz, R. L., M. A. Gao, K. Lo, Y. H. Lao, M. Li and K. W. Leong (2018). "CRISPR Technology for Breast Cancer: Diagnostics, Modeling, and Therapy." Adv Biosyst **2**(11).

Mishra, R. R., N. Belder, S. A. Ansari, M. Kayhan, H. Bal, U. Raza, P. G. Ersan, M. Tokat Ü, E. Eyüpoğlu, Ö. Saatci, P. Jandaghi, S. Wiemann, A. Üner, C. Cekic, Y. Riazalhosseini and Ö. Şahin (2018). "Reactivation of cAMP Pathway by PDE4D Inhibition Represents a Novel Druggable Axis for Overcoming Tamoxifen Resistance in ER-positive Breast Cancer." Clin Cancer Res **24**(8): 1987-2001.

Monteith, G. R., N. Prevarskaya and S. J. Roberts-Thomson (2017). "The calcium-cancer signalling nexus." Nat Rev Cancer **17**(6): 367-380.

Morera, F. J., J. Saravia, J. P. Pontigo, L. Vargas-Chacoff, G. F. Contreras, A. Pupo, Y. Lorenzo, K. Castillo, C. Tilegenova, L. G. Cuello and C. Gonzalez (2015). "Voltage-dependent BK and Hv1 channels expressed in non-excitable tissues: New therapeutics opportunities as targets in human diseases." Pharmacol Res **101**: 56-64.

MRC (1992). "Medical Research Council trial of treatment of hypertension in older adults: principal results. MRC Working Party." Bmj **304**(6824): 405-412.

Nanayakkara, A. K., C. A. Follit, G. Chen, N. S. Williams, P. D. Vogel and J. G. Wise (2018). "Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells." Sci Rep **8**(1): 967.

Ni, H., Q. Rui, X. Zhu, Z. Yu, R. Gao and H. Liu (2017). "Antihypertensive drug use and breast cancer risk: a meta-analysis of observational studies." Oncotarget **8**(37): 62545-62560.

Ninomiya, W., K. Mizobuchi, T. Hayashi, S. Okude, S. Katagiri, A. Kubo, N. Masuhara and T. Nakano (2020). "Electroretinographic abnormalities associated with pregabalin: a case report." Doc Ophthalmol **140**(3): 279-287.

Oancea, E. and T. Meyer (1998). "Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals." Cell **95**(3): 307-318.

Oheim, M., F. Kirchhoff and W. Stühmer (2006). "Calcium microdomains in regulated exocytosis." Cell Calcium **40**(5-6): 423-439.

Pahor, M., J. M. Guralnik, M. E. Salive, M. C. Corti, P. Carbonin and R. J. Havlik (1996). "Do calcium channel blockers increase the risk of cancer?" Am J Hypertens **9**(7): 695-699.

Pandya, S. and R. G. Moore (2011). "Breast development and anatomy." Clin Obstet Gynecol **54**(1): 91-95.

Patel, F. and W. J. Brackenbury (2015). "Dual roles of voltage-gated sodium channels in development and cancer." Int J Dev Biol **59**(7-9): 357-366.

Peng, L., J. Jiang, B. Tang, E. C. Nice, Y. Y. Zhang and N. Xie (2020). "Managing therapeutic resistance in breast cancer: from the lncRNAs perspective." Theranostics **10**(23): 10360-10377.

Phan, N. N., C. Y. Wang, C. F. Chen, Z. Sun, M. D. Lai and Y. C. Lin (2017). "Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy." Oncol Lett **14**(2): 2059-2074.

Pitt, G. S., M. Matsui and C. Cao (2021). "Voltage-Gated Calcium Channels in Nonexcitable Tissues." Annu Rev Physiol **83**: 183-203.

Plummer, M., C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray and S. Franceschi (2016). "Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis." Lancet Glob Health **4**(9): e609-616.

Pratt, S. J. P., E. Hernández-Ochoa and S. S. Martin (2020). "Calcium signaling: breast cancer's approach to manipulation of cellular circuitry." Biophysical Reviews **12**(6): 1343-1359.

Prevarskaya, N., R. Skryma and Y. Shuba (2018). "Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?" Physiol Rev **98**(2): 559-621.

Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, F. Baehner, D. J. Dabbs, T. Decker, V. Eusebi, S. B. Fox, S. Ichihara, J. Jacquemier, S. R. Lakhani, J. Palacios, A. L. Richardson, S. J. Schnitt, F. C. Schmitt, P. H. Tan, G. M. Tse, S. Badve and I. O. Ellis (2010). "Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade." Breast Cancer Res **12**(4): 207.

Rosendo-Pineda, M. J., C. M. Moreno and L. Vaca (2020). "Role of ion channels during cell division." Cell Calcium **91**: 102258.

Roux, B. (2017). "Ion channels and ion selectivity." Essays Biochem **61**(2): 201-209.

Samanta, A., T. E. T. Hughes and V. Y. Moiseenkova-Bell (2018). "Transient Receptor Potential (TRP) Channels." Sub-cellular biochemistry **87**: 141-165.

Samanta, K. and A. B. Parekh (2017). "Spatial Ca(2+) profiling: decrypting the universal cytosolic Ca(2+) oscillation." J Physiol **595**(10): 3053-3062.

Santillán, G., C. Baldi, S. Katz, G. Vazquez and R. Boland (2004). "Evidence that TRPC3 is a molecular component of the 1alpha,25(OH)2D3-activated capacitative calcium entry (CCE) in muscle and osteoblast cells." J Steroid Biochem Mol Biol **89-90**(1-5): 291-295.

Sapio, L., M. Gallo, M. Illiano, E. Chiosi, D. Naviglio, A. Spina and S. Naviglio (2017). "The Natural cAMP Elevating Compound Forskolin in Cancer Therapy: Is It Time?" J Cell Physiol **232**(5): 922-927.

Seitter, H. and A. Koschak (2018). "Relevance of tissue specific subunit expression in channelopathies." Neuropharmacology **132**: 58-70.

Sharma, S., S. Y. Wu, H. Jimenez, F. Xing, D. Zhu, Y. Liu, K. Wu, A. Tyagi, D. Zhao, H. W. Lo, L. Metheny-Barlow, P. Sun, J. D. Bourland, M. D. Chan, A. Thomas, A. Barbault, R. B. D'Agostino, C. T. Whitlow, V. Kirchner, C. Blackman, B. Pasche and K. Watabe (2019). "Ca(2+) and CACNA1H mediate targeted suppression of breast cancer brain metastasis by AM RF EMF." EBioMedicine **44**: 194-208.

Shih, J. H., L. T. Kao, C. H. Chung, G. S. Liao, L. Y. Fann, W. C. Chien and I. H. Li (2020). "Protective Association Between Calcium Channel Blocker Use and Breast Cancer Recurrence in Postsurgical Women: A Population-Based Case-Control Study in Taiwan." J Clin Pharmacol **60**(6): 785-792.

Simpson, P. T., J. S. Reis-Filho, T. Gale and S. R. Lakhani (2005). "Molecular evolution of breast cancer." J Pathol **205**(2): 248-254.

Son, J., J. H. Lee, H. N. Kim, H. Ha and Z. H. Lee (2010). "cAMP-response-element-binding protein positively regulates breast cancer metastasis and subsequent bone destruction." Biochem Biophys Res Commun **398**(2): 309-314.

Stangherlin, A., A. Koschinski, A. Terrin, A. Zoccarato, H. Jiang, L. A. Fields and M. Zaccolo (2014). "Analysis of compartmentalized cAMP: a method to compare signals from differently targeted FRET reporters." Methods Mol Biol **1071**: 59-71.

Stewart, B. and C. Wild (2014). World cancer report 2014, World Health Organization

Stewart, T. A., K. T. Yapa and G. R. Monteith (2015). "Altered calcium signaling in cancer cells." Biochim Biophys Acta **1848**(10 Pt B): 2502-2511.

Stratton, M. R., P. J. Campbell and P. A. Futreal (2009). "The cancer genome." Nature **458**(7239): 719-724.

Tadic, M., C. Cuspidi, E. Belyavskiy and G. Grassi (2019). "Intriguing relationship between antihypertensive therapy and cancer." Pharmacol Res **141**: 501-511.

Tajada, S. and C. Villalobos (2020). "Calcium Permeable Channels in Cancer Hallmarks." Front Pharmacol **11**: 968.

Tajbakhsh, A., A. Pasdar, M. Rezaee, M. Fazeli, S. Soleimanpour, S. M. Hassanian, Z. FarshchiyanYazdi, T. Younesi Rad, G. A. Ferns and A. Avan (2018). "The current status and perspectives regarding the clinical implication of intracellular calcium in breast cancer." J Cell Physiol **233**(8): 5623-5641.

Tak, P. P. and G. S. Firestein (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." J Clin Invest **107**(1): 7-11.

Tan, Y. Z., D. D. Fei, X. N. He, J. M. Dai, R. C. Xu, X. Y. Xu, J. J. Wu and B. Li (2019). "L-type voltage-gated calcium channels in stem cells and tissue engineering." Cell Prolif **52**(4): e12623.

Tang, C., D. Liu, Y. Fan, J. Yu, C. Li, J. Su and C. Wang (2021). "Visualization and bibliometric analysis of cAMP signaling system research trends and hotspots in cancer." J Cancer **12**(2): 358-370.

Tsang, J. Y. S. and G. M. Tse (2020). "Molecular Classification of Breast Cancer." Adv Anat Pathol **27**(1): 27-35.

Turner, R. R., L. Steed, H. Quirk, R. U. Greasley, J. M. Saxton, S. J. Taylor, D. J. Rosario, M. A. Thaha and L. Bourke (2018). "Interventions for promoting habitual exercise in people living with and beyond cancer." Cochrane Database Syst Rev **9**(9): Cd010192.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med **319**(9): 525-532.

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nat Med **10**(8): 789-799.

Wang, C. Y., M. D. Lai, N. N. Phan, Z. Sun and Y. C. Lin (2015). "Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients." PLoS One **10**(7): e0125766.

Wang, W., S. A. Nag and R. Zhang (2015). "Targeting the NFκB signaling pathways for breast cancer prevention and therapy." Curr Med Chem **22**(2): 264-289.

Waterhouse, M. P., R. Ugur and W. T. Khaled (2019). "Therapeutic and Mechanistic Perspectives of Protein Complexes in Breast Cancer." Front Cell Dev Biol **7**: 335.

Wilson, K. A. and A. Waugh (2006). Ross and Wilson Anatomy and Physiology in Health and Illness. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Winters, S., C. Martin, D. Murphy and N. K. Shokar (2017). "Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening." Prog Mol Biol Transl Sci **151**: 1-32.

Wong, P.-P., F. Demircioglu, E. Ghazaly, W. Alrawashdeh, Michael R. L. Stratford, Cheryl L. Scudamore, B. Cereser, T. Crnogorac-Jurcevic, S. McDonald, G. Elia, T. Hagemann, Hemant M. Kocher and Kairbaan M. Hodivala-Dilke (2015). "Dual-Action Combination Therapy Enhances Angiogenesis while Reducing Tumor Growth and Spread." Cancer Cell **27**(1): 123-137.

World Health Organization, W. (2020). "Cancer Today." Retrieved November 2021, from https://gco.iarc.fr/today/home.

World Health Organization, W. (2021). "Breast cancer." Retrieved November 2021, from https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer.

World Health Organization, W. (2021). "Cancer." Retrieved October 2021, 2021, from https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer.

Xia, L., S. Tan, Y. Zhou, J. Lin, H. Wang, L. Oyang, Y. Tian, L. Liu, M. Su, H. Wang, D. Cao and Q. Liao (2018). "Role of the NFκB-signaling pathway in cancer." Onco Targets Ther **11**: 2063-2073.

Yan, K., L. N. Gao, Y. L. Cui, Y. Zhang and X. Zhou (2016). "The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review)." Mol Med Rep **13**(5): 3715-3723.

Yang, Z., Z. Yue, X. Ma and Z. Xu (2020). "Calcium Homeostasis: A Potential Vicious Cycle of Bone Metastasis in Breast Cancers." Front Oncol **10**: 293.

Zamponi, G. W., J. Striessnig, A. Koschak and A. C. Dolphin (2015). "The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential." Pharmacol Rev **67**(4): 821-870.

Zhang, H., Q. Kong, J. Wang, Y. Jiang and H. Hua (2020). "Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer." Exp Hematol Oncol **9**(1): 32.

Zhao, T., D. Guo, Y. Gu and Y. Ling (2017). "Nifedipine stimulates proliferation and migration of different breast cancer cells by distinct pathways." Mol Med Rep **16**(2): 2259-2263.

Zhao, Y., Q. Wang, X. Zhao, H. Meng and J. Yu (2018). "Effect of antihypertensive drugs on breast cancer risk in female hypertensive patients: Evidence from observational studies." Clin Exp Hypertens **40**(1): 22-27.

Zheng, W., M. Li, Y. Lin and X. Zhan (2018). "Encapsulation of verapamil and doxorubicin by MPEG-PLA to reverse drug resistance in ovarian cancer." Biomedicine & Pharmacotherapy **108**: 565-573.

Zhong, H., H. SuYang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S. Ghosh (1997). "The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism." Cell **89**(3): 413-424.

Zinatizadeh, M. R., B. Schock, G. M. Chalbatani, P. K. Zarandi, S. A. Jalali and S. R. Miri (2021). "The Nuclear Factor Kappa B (NF-kB) signaling in cancer development and immune diseases." Genes Dis **8**(3): 287-297.