

FLÁVIA CARVALHO AGUIAR

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DOS CANAIS DE Ca^{2+}
DEPENDENTES DE VOLTAGEM DO TIPO L E T EM PROLIFERAÇÕES
EPITELIAIS DUCTAIS NEOPLÁSICAS E NÃO NEOPLÁSICAS NA MAMA
HUMANA

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-graduação em Patologia
Belo Horizonte - MG
2021

Flávia Carvalho Aguiar

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DOS CANAIS DE Ca^{2+} DEPENDENTES DE
VOLTAGEM DO TIPO L E T EM PROLIFERAÇÕES EPITELIAIS DUCTAIS
NEOPLÁSICAS E NÃO NEOPLÁSICAS NA MAMA HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia - área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

Coorientador: Dr^a. Andreia Laura Prates Rodrigues

Belo Horizonte
2021

AG282 Aguiar, Flávia Carvalho.
Análise da Imunoexpressão dos canais de CA2+ dependentes de voltagem do tipo L e T em proliferações Epiteliais Ductais Neoplásicas e não Neoplásicas na mama humana [manuscrito]. / Flávia Carvalho Aguiar. - Belo Horizonte: 2021.
78f.: il.
Orientador (a): Enio Ferreira.
Coorientador (a): Andreia Laura Prates Rodrigues.
Área de concentração: Patologia Humana.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da Mama. 2. Carcinoma Intraductal não Infiltrante. 3. Carcinoma Ductal. 4. Imuno-Histoquímica. 5. Mulheres. 6. Dissertação Acadêmica. I. Ferreira, Enio. II. Rodrigues, Andreia Laura Prates. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WP 870

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Análise da Imunoexpressão dos Canais de Ca²⁺ Dependentes de Voltagem do Tipo L e T em Proliferações Epiteliais Ductais Neoplásicas e não Neoplásicas na Mama Humana”

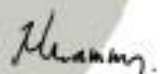
FLÁVIA CARVALHO AGUIAR

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em **PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 25 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:



Profa. Sara Santos Bernardes
Departamento Patologia Geral – ICB/UFMG



Prof. Roger Chammas
Universidade de São Paulo – USP/SP



Prof. Andréia Lajra Prates Rodrigues
UFMG - CO-ORIENTADORA



Prof. Enio Ferreira
ICB/UFMG - ORIENTADOR

Belo Horizonte, 25 de março de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer meus pais, por toda a dedicação e incentivo em me ensinar a ir atrás de conhecimento e incentivando a tomar minhas próprias decisões em busca de conquistar meus objetivos. Ao meu irmão, por ser sempre meu exemplo de esforço e dedicação; à minha cunhada, por me ajudar a levar os momentos de forma mais leve; e por fim, ao meu namorado, por me encorajar, me apoiar e dar suporte em todas as situações.

Ao meu orientador, Enio Ferreira, que me aceitou de braços abertos, e me mostrou que é possível ser um profissional sério e dedicado, mas tranquilo e cheio de compaixão, se tornando um grande exemplo.

À minha coorientadora, Andreia Laura, que abriu as portas da ciência para mim, me apresentando esse mundo e sempre estando disponível a me inserir nele, cada vez mais.

Ao Professor Jader Cruz, que assim como a Andreia Laura, me apresentou a ciência, permitindo o uso de seu espaço e se mostrando um grande pesquisador. À Paula Rhana, que acompanhou toda a trajetória até aqui estando sempre disponível a me ensinar. Saiba que nossas conversas sempre agregaram muito para mim.

A todos os colaboradores, professor Enrrico Bloise, professora Cristiana Buzelin e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, por cederem o material necessário para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos do Laboratório do Comportamento Celular, que me receberam compartilhando conhecimentos e experiências, em especial à Santuza e ao Renato, assim como a Fernanda e a Clara que compartilharam também os desesperos e as risadas durante esses dois anos. Espero ver vocês brilhando, cada vez mais, no caminho que irão percorrer.

Aos meus amigos e familiares por entenderem que esse era meu objetivo e me apoiarem nessa jornada.

A todos os professores, profissionais e colegas que em algum momento contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Ao CNPq, à FAPEMIG e à CAPES pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Comportamento Celular do Departamento de Patologia Geral – ICB / UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

RESUMO

O câncer de mama é considerado o tumor de maior incidência entre as mulheres, além de ser o responsável pelo maior número de mortes causadas por câncer nessa parcela da população. Entre as várias classificações histológicas que essa neoplasia apresenta, o carcinoma ductal invasor é o mais comum e sugere-se que o seu surgimento seja traçado em etapas, definindo as lesões ductais hiperplásicas e os carcinomas ductais *in situ*, como alterações predecessoras ao seu surgimento. Essas lesões epiteliais apresentam em comum alterações na proliferação celular, um processo altamente controlado por ciclinas, quinases dependentes de ciclinas e também pela concentração intracelular dos íons cálcio. O Ca^{2+} é um segundo mensageiro cuja sinalização é capaz de regular além da proliferação, diversas funções celulares, como apoptose, migração e transcrição gênica, estando esses, envolvidos nas alterações encontradas em células neoplásicas. A sinalização de Ca^{2+} é dependente do aumento da sua concentração intracelular, que por sua vez, é dependente de proteínas transportadoras desse íon, como por exemplo, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L ($\text{Cav}1.1$, $\text{Cav}1.2$, $\text{Cav}1.3$ e $\text{Cav}1.4$) do tipo T ($\text{Cav}3.1$, $\text{Cav}3.2$ e $\text{Cav}3.3$). Esses canais são geralmente associados a células excitáveis, porém sua presença já foi vista em células não excitáveis, incluindo células tumorais. Além disso, a expressão de RNAm desses canais já foi vista alterada em neoplasias, gerando indícios da participação dos canais do tipo L e do T no desenvolvimento neoplásico. Porém, seu comportamento de expressão e sua localização subcelular não foi descrita no epitélio mamário sem alteração e em lesões epiteliais ductais proliferativas, não neoplásicas e neoplásicas, de mama humana, sendo esse o objetivo principal desse trabalho. Para isso, foi avaliada a expressão proteica de $\text{Cav}1.1$, $\text{Cav}1.2$, $\text{Cav}1.3$, $\text{Cav}3.1$, $\text{Cav}3.2$ e $\text{Cav}3.3$, por meio da técnica de imuno-histoquímica no epitélio mamário sem alteração, lesões epiteliais ductais hiperplásicas e carcinomas ductais *in situ* e invasores. Foi possível observar uma redução da expressão nuclear dos canais do tipo L e do tipo T em lesões neoplásicas, excetuando o $\text{Cav}1.2$, que aparentemente não tem sua expressão alterada. Somado a isso, observa-se um aumento da expressão citoplasmática das isoformas $\text{Cav}3.1$ e $\text{Cav}3.2$, entre os processos de transformação neoplásica do epitélio mamário. Surpreendentemente, apenas as isoformas $\text{Cav}1.2$, $\text{Cav}1.3$ e $\text{Cav}3.3$ apresentaram expressão membranar, indicando que nas outras isoformas esse canais não estão presentes na membrana celular, sugerindo sua participação através de outros compartimentos subcelulares. Os resultados evidenciam a presença e a possível participação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e T nos processos de transformação das lesões hiperplásicas em carcinomas ductais, *in situ* e invasores e apontam para uma possível forma de controle e tratamento precoce do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Hiperplasia ductal. Carcinoma ductal *in situ*. Canal de Ca^{2+} dependente de voltagem tipo T. Canal de Ca^{2+} dependente de voltagem tipo L.

ABSTRACT

Breast cancer is considered the tumour with the highest incidence among women, besides being responsible for the highest number of deaths caused by cancer in this part of the population. Among the various histological classifications, invasive ductal carcinoma is the most common and it was suggested that its neoplastic transformation occurs in steps, defining hyperplastic ductal lesions and ductal carcinomas *in situ*, as alterations predecessor to their development. These epithelial lesions have in common changes in cell proliferation, a process highly controlled by cyclins, cyclin-dependent kinases and also by the intracellular concentration of calcium ions. Ca^{2+} is a second messenger whose signalling can regulate, in addition to proliferation, several cellular functions, such as apoptosis, migration and gene transcription, which are all involved in changes found in neoplastic cells. Ca^{2+} signalling is dependent on the increase of its intracellular concentration, that dependent on transporting proteins, such as the L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels ($\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v1.4$) and the T-type ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ and $\text{Ca}_v3.3$). These channels are generally associated with excitable cells, but their presence has already been seen in non-excitable tissues, including tumour cells. Also, its mRNA expression has already been seen altered in neoplasms, indicating the participation of L and T-type channels in neoplastic development. However, its expression behaviour and its subcellular location have not been described in the mammary epithelium without alteration and in proliferative, non-neoplastic and neoplastic ductal epithelial lesions of the human breast, which is the main objective of this work. For this, the protein expression of $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ and $\text{Ca}_v3.3$ was evaluated, using the immunohistochemistry technique in the mammary epithelium without alteration, ductal hyperplasias and ductal carcinomas *in situ* and invasive. It was possible to observe a reduction in the nuclear expression of L-type and T-type channels in neoplastic lesions, except for $\text{Ca}_v1.2$, which does not have its expression altered. Besides, there is an increase in the cytoplasmic expression of the $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$, among the processes of neoplastic transformation of the mammary epithelium. Surprisingly, only the $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ and $\text{Ca}_v3.3$ isoforms showed membrane expression, indicating that in the other isoforms these channels are not present in the cell membrane, suggesting their participation through other subcellular compartments. The results show the presence and possible participation of L and T-type voltage-dependent Ca^{2+} channels in the neoplastic transformation to invasive ductal carcinomas and point to a possible way of control and early treatment of breast cancer.

Keywords: Breast cancer. Ductal hyperplasia. Ductal carcinoma *in situ*. T-type voltage-dependent Ca^{2+} channels. L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels.

LISTA DE TABELAS

Artigo

- Tabela 1** Pearson correlation coefficient matrix of Cav3.1 immunohistochemical staining. ...**44**
- Tabela 2** Percentage of cases with cytoplasmic immunostaining categorized in absent expression, and weak, moderate, or strong intensity of labelling for Cav3.1.**44**
- Tabela 3** Pearson correlation coefficient matrix for Cav3.2 immunohistochemical staining. ...**45**
- Tabela 4** Percentage of cases with cytoplasmic immunostaining categorized in absent expression, and weak, moderate, or strong intensity of labelling for Cav3.2.**45**
- Tabela 5** Pearson correlation coefficient matrix for Cav3.3 immunohistochemical staining. ...**46**
- Tabela 6** Percentage of cases with cytoplasmic immunostaining categorized in absent expression, and weak, moderate, or strong intensity of labelling for Cav3.3.**46**

Short Communication

- Tabela 1** Pearson correlation coefficient matrix for Cav1.3 immunohistochemical staining. ...**61**
- Tabela 2** Pearson correlation coefficient matrix of Cav1.1 immunohistochemical staining.**61**
- Tabela 3** Percentage of cases with cytoplasmic immunostaining categorized in no expression, and weak, moderate, or strong intensity of Cav1.1, Cav1.2 and Cav1.3 immunostaining.**62**
- Tabela 4** Percentage of cases with membranar immunostaining categorized in no expression, <25%, 25% a 50%, or <50% of Cav1.2 and Cav1.3 immunostaining.**63**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Anticorpos primários e seus respectivos fabricantes, clones, diluições e controles positivos e tipo de soro utilizado nos controles negativos.	30
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Artigo

Figura 1 Classification of histological types.	47
Figura 2 Human mammary glands with immunohistochemical staining for Cav3.1.	48
Figura 3 Human mammary glands with immunohistochemical staining for Cav3.2.	49
Figura 4 Human mammary glands with immunohistochemical staining for Cav3.3.	50

Short communication

Figura 1 Human mammary glands with immunostaining for Cav1.1, Cav1.2 and Cav1.3.	64
--	-----------

ABREVIATURAS E SIGLAS

BWA: *Breast without alteration* (Mama sem alteração)

Ca_v3: *T-type voltage-dependent Ca²⁺ channels* (Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo T)

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP: Comitê de Ética e Pesquisa

DAB: 3'3-diaminobenzidina

DCIS: Ductal carcinoma *in situ* (Carcinoma ductal *in situ*)

DH: *Ductal hyperplasia* (Hiperplasia ductal)

ER: Receptor de estrogênio

FAPEMIG: Fundação de Ampara à Pesquisa de Minas Gerais

HER2: *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* (Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano)

HVA: *high voltage activated* (Canais de cálcio ativados por alta voltagem)

IDC: *Invasive ductal carcinoma* (Carcinoma ductal invasor)

LVA: *low voltage activated* (Canais de cálcio ativados por baixa voltagem)

LTCC: *L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels* (Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo L)

PR: Receptor de progesterona

TRP: canais iônicos potencial receptor transiente

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UTDL: Unidade terminal ductolobular

VGCC: *voltage gated calcium channels* (Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 <i>Alterações proliferativas mamárias.....</i>	<i>16</i>
2.1.1 <i>Hiperplasias ductais.....</i>	<i>17</i>
2.1.2 <i>Carcinoma ductal in situ.....</i>	<i>19</i>
2.1.3 <i>Carcinoma ductal invasor.....</i>	<i>21</i>
2.2 <i>Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem.....</i>	<i>23</i>
2.2.1 <i>Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo L.....</i>	<i>24</i>
2.2.2 <i>Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo T.....</i>	<i>25</i>
2.3 <i>Alterações proliferativas e sua relação com canais de Ca²⁺.....</i>	<i>26</i>
3 OBJETIVOS	30
3.1 <i>Geral.....</i>	<i>30</i>
3.2 <i>Específicos.....</i>	<i>30</i>
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 <i>Aspectos Éticos.....</i>	<i>31</i>
4.2 <i>Espécimes.....</i>	<i>31</i>
4.3 <i>Avaliação Histopatológica.....</i>	<i>31</i>
4.4 <i>Imuno-histoquímica.....</i>	<i>31</i>
4.5 <i>Interpretação da Imuno-histoquímica.....</i>	<i>32</i>
4.6 <i>Análise Estatística.....</i>	<i>33</i>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 <i>Artigo.....</i>	<i>35</i>
5.2 <i>Short Communication.....</i>	<i>53</i>
6 CONCLUSÕES.....	67
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO.....	75
<i>Anexo A Parecer consubstanciado do CEP Universidade Federal de Minas Gerais.....</i>	<i>75</i>
<i>Anexo B Parecer consubstanciado do CEP Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.....</i>	<i>78</i>

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer pode ser considerado um dos principais problemas de saúde pública no mundo e, inclusive, já está entre as quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de idade, se apresentando como importante barreira para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo no século 21 (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, a estimativa é de que para cada ano do triênio 2020-2022 sejam diagnosticados 625 mil novos casos, sendo 66 mil de neoplasias mamárias (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019).

O câncer de mama, além de sua alta incidência, apresenta alta mortalidade, sendo o responsável pelo maior número de mortes causadas por câncer nas mulheres tanto no Brasil, quanto globalmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019). Dentre as diversas classificações histológicas do câncer de mama, o carcinoma ductal invasor é o mais comum (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018) e pode ter como lesões precursoras não obrigatórias, ou seja, lesões que podem anteceder seu desenvolvimento, as hiperplasias ductais e os carcinomas ductais *in situ* (SIMPSON, 2005; LOPEZ-GARCIA, 2010).

Essas lesões apresentam em comum o aumento do número de células epiteliais, devido ao estímulo proliferativo exacerbado (SHEA; KOH; TAN, 2020; ORR; KELLEY, 2016). Existem várias vias de sinalização celular responsáveis pelo controle da proliferação, todos atuando em conjunto, para que as etapas desse processo ocorram de forma equilibrada e de acordo com a necessidade dos tecidos. Por essa razão, pequenas alterações nesses fatores, como na concentração intracelular dos íons cálcio, podem resultar em uma maior taxa proliferativa em células neoplásicas (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; WENZEL; SINGH, 2018).

O Ca^{2+} está envolvido na regulação da proliferação celular, mas também participa de processos como apoptose, transcrição gênica e migração, todos sabidamente alterados em células neoplásicas (HUMEAU *et al.*, 2018). Para gerar a sinalização necessária para modular esses processos, o Ca^{2+} precisa alterar sua concentração dentro da célula, e para que isso aconteça, ele pode ser derivado do meio extracelular ou liberado de depósitos intracelulares, por meio de canais, bombas ou trocadores desse íon (MONTEITH; PREVARSKAYA; ROBERTS-THOMSON, 2017).

Entre os transportadores desse íon estão os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, proteínas transmembrana que demandam uma diferença de potencial elétrico para serem abertos, permitindo assim a passagem do íon. Por isso, são comumente encontrados em células excitáveis, porém a presença de algumas de suas subclassificações já foi observada em células não excitáveis, inclusive células tumorais (CATTERALL, 2011; PITT; MATSUI; CAO, 2021).

Dentre os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, já foi demonstrado uma maior expressão de RNAm relacionado aos canais do tipo L e do tipo T, em tumores de mama quando comparados à glândula mamária sem alteração (WANG *et al.*, 2015; PHAN *et al.*, 2017). Além disso, em diferentes tumores, esses canais foram associados à proliferação, migração, apoptose e progressão tumoral (GARIB *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2015; JACQUEMET *et al.*, 2016; BERTOLESI *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2008; BASSON *et al.*, 2015). Porém, até o momento, pouco se sabe sobre os mecanismos pelo qual agem nas células neoplásicas e qual o comportamento e expressão em células que apresentam comportamentos pré-neoplásicos, como as hiperplasias ductais mamárias.

É evidente a importância desses canais para o controle da concentração intracelular de Ca^{2+} e, conseqüentemente, para a regulação de processos celulares importantes para o desenvolvimento tumoral. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a expressão proteica e as possíveis alterações de expressão dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, do tipo L e T, em lesões hiperplásicas e neoplásicas ductais da glândula mamária. Propomos assim, compreender sobre a etiologia e fisiopatologia do câncer de mama, bem como sugerir o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e de tratamentos precoces mais eficazes para esse tipo tumoral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alterações proliferativas mamárias

As mamas são consideradas anexos da pele, uma vez que parte da sua constituição são de glândulas cutâneas modificadas. Além das glândulas, há em sua estrutura tecido conjuntivo e tecido adiposo (WALDMAN *et al.*, 2019). A partir da puberdade feminina, devido ação dos hormônios sexuais, as mamas começam a se desenvolver dando origem a um sistema ramificado de ductos e lóbulos (SILVA, 2018). Os lóbulos, também conhecidos por unidades terminais ducto lobulares (UTDL), são a estrutura funcional da mama e são compostos por vários ductos intralobulares (RUSSO; RUSSO, 2004). Esses são revestidos por uma dupla camada de células, sendo a mais interna composta por células luminais, que são cuboídes/colunares. Já a camada mais externa é formada por células mioepiteliais que são especializadas em contração e geralmente apresentam-se com formato mais alongado (HASSIOTOU; GEDDES, 2012).

Diversas alterações fisiológicas, relacionadas ao desenvolvimento mamário, tem sido observada ao longo dos anos. Porém, além dessas alterações, é possível observar uma variedade de processos patológicos mamários, divididas em dois grandes grupos: lesões benignas e malignas. (WALDMAN *et al.*, 2019).

Dentro desse grande grupo de lesões benignas é possível separar as lesões não neoplásicas, e essas podem ser classificadas em: (a) Doenças inflamatórias, como é visto nas mastites; (b) Necrose do tecido adiposo; (c) Doenças relacionadas à lactação, como a galactocele; (d) Hiperplasia pseudoangiomatoide; (e) Lesões de células colunares; (f) Alterações não proliferativas, como cistos, metaplasia apócrina e fibrose periductal; (g) Lesões proliferativas, que podem ser adenoses, cicatrizes radiais e hiperplasias epiteliais, tanto ductais como lobulares e que apresentem ou não atipia. (MEISNER; FEKRAZAD; ROYCE, 2008; NEAL *et al.*, 2014; ORR; KELLEY, 2016).

As lesões proliferativas, principalmente as hiperplasias ductais, recebem atenção especial, uma vez que mulheres que apresentam esse diagnóstico tem maior risco de desenvolver carcinoma invasor de mama (SALAMAT, 2018). Esse risco é ainda maior nos casos em que houver atipia celular. Essa importância é ressaltada pela informação de que as lesões proliferativas representam aproximadamente entre um terço e um quarto de todas as biopsias de alterações benignas e dessas, 5 a 10% apresentam atipia (VOGEL, 2004).

Já o grupo de lesões malignas consiste nas neoplasias malignas, onde o carcinoma invasor é o principal deles (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018). Ele apresenta grande importância epidemiológica, sendo, segundo o Instituto Nacional De Câncer (2019) o mais comum entre as mulheres, excetuando tumores de pele não melanoma. Foi estimado que em cada ano do triênio 2020-2022 serão diagnósticos mais de 66 mil novos casos de câncer de mama no Brasil. Assim como as hiperplasias, os carcinomas podem ser ductais ou lobulares. Essas lesões são categorizadas em *in situ* e invasoras, de acordo com sua extensão e localização. Há ainda como segregá-las em subtipos de acordo com sua expressão molecular de Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), de receptores de estrógeno (ER) e de progesterona (PR), assim um melhor prognóstico pode ser definido para cada paciente (WATKINS, 2019).

2.1.1 Hiperplasias ductais

O risco aumentado que as lesões proliferativas apresentam para o desenvolvimento do carcinoma invasor de mama foi avaliado inicialmente por Dupont e Page (1985) em um estudo de coorte retrospectivo. Os resultados demonstram que mulheres diagnosticadas com hiperplasias usuais, ou seja, sem atipias celulares mostram duas vezes mais chance de desenvolver o carcinoma invasor de mama. Enquanto as com hiperplasias atípicas têm de quatro a cinco vezes mais chance de que essa evolução aconteça. Caso essa atipia celular venha acompanhada de um histórico familiar de câncer de mama, esse risco é ainda mais aumentado. Esses achados da década de 80 permanecem atuais e corroborados por diversos autores (COLLINS, 2007; WORSHAM, 2007; HARTMAN, 2014; MENES, 2017).

Historicamente, partindo de estudos epidemiológicos baseados em características morfológicas, a transformação neoplásica para o carcinoma ductal invasor de mama foi traçada como um modelo de etapas, semelhante ao modelo de Vogelstein (1988) para o carcinoma de colón. A primeira dessas etapas é a hiperplasia ductal usual que pode se transformar em a atípica, seguido pelo carcinoma ductal *in situ* de baixo grau, e por fim o ductal invasor. Dando sequência aos estudos morfológicos, análises moleculares foram feitas demonstrando que essa transformação não é tão linear como proposto, porém elas permanecem como possíveis precursores para o carcinoma ductal invasor (WELLINGS; JENSEN, 1973; AUBELE, 2000; GOING, 2003; SIMPSON, 2005; LOPEZ-GARCIA, 2010).

Podendo ser vista como a primeira etapa para o desenvolvimento do carcinoma ductal invasor, as hiperplasias ductais consistem no aumento da proliferação das células luminais, com formação de três ou mais camadas de células epiteliais acima da membrana basal dos ductos mamários. Nessa lesão não há aumento do número de ácinos, como é visto nas adenoses. Além disso, as hiperplasias ductais podem ser classificadas em usuais e atípicas, de acordo com características citológicas e de organização arquitetural dessa proliferação (NEAL *et al.*, 2014; ORR; KELLEY, 2016).

A hiperplasia ductal usual é caracterizada por uma proliferação de células policlonais, onde tanto as células epiteliais como as mioepiteliais estão se multiplicando (SEWELL, 2004). Como as células são policlonais, elas se apresentam em tamanhos variados e em diferentes sentidos de crescimento, sendo frequente a sobreposição celular, tornando difícil identificar o limite entre as células. Essa proliferação segue em direção ao lúmen do ducto fazendo com que lúmens secundários, periféricos e comprimidos sejam formados. Pode ainda haver a formação de pontes afiladas ou projeções em direção ao centro do ducto (SIMPSON, 2009). Para auxiliar o diagnóstico dessa lesão técnicas imuno-histoquímicas podem ser realizadas. As hiperplasias usuais expressam marcação irregular, em padrão de mosaico, tanto para citoqueratinas de alto peso molecular, como ER (EAST; CARTER; KLEER, 2018).

A hiperplasia ductal atípica, assim como a usual, apresenta um aumento do número de camadas celulares acima da membrana basal. Porém, essa lesão se mostra muito mais semelhante ao carcinoma ductal *in situ* (PAGE, 1985).

Diferente da hiperplasia ductal usual, a proliferação presente na hiperplasia atípica é composta por células monoclonais. Essa característica faz com que as células sejam mais uniformes, monomórficas, hipercromáticas e tenham bordas mais distintas. Devido essa proliferação uniforme, os lúmens secundários são nítidos e regulares (PAGE, 1985; SEWELL, 2004). Arquiteturalmente essa lesão pode ser classificada em padrões: (a) sólido; (b) cribriforme, onde os lúmens secundários são evidentes e arredondados, e as pontes celulares se mostram rígidas; (c) micropapilar, na qual há formação de projeções em direção ao centro do ducto com a extremidade proximal a membrana basal mais estreita; (d) combinação dos elementos citados anteriormente (SIMPSON, 2009).

A extensão e o acometimento dos lóbulos pelas hiperplasias ductais atípicas é uma característica importante, visto que, é um dos principais pontos que permite diferenciar essa lesão dos carcinomas ductais *in situ* de baixo grau. Para que essa hiperplasia seja diagnosticada ela deve

envolver incompletamente os espaços afetados. Caso acometam completamente a região, devem ocupar menos de duas UTDL adjacentes ou ser menor que 2 mm de extensão (PINDER; ELLIS, 2003; COLLINS, 2018).

As técnicas imuno-histoquímicas com marcação para citoqueratinas de alto peso molecular e para ER auxiliam no diagnóstico diferencial com a hiperplasia ductal usual. As células da hiperplasia atípica não apresentam marcação para essas citoqueratinas e expressam marcação difusa para ER (EAST; CARTER; KLEER, 2018). O estudo molecular dessas lesões puras mostra uma variedade de locos que podem ser adquiridos ou perdidos, mas o principal deles é a perda de 16q e ganho de 1q, que também é comumente visto em carcinomas mamários (KADER *et al.*, 2018). Ao analisar geneticamente essas lesões associadas a carcinomas ductais *in situ* e invasores, pode ser observado alterações significativas que estão presentes nas hiperplasias ductais atípicas e permanecem nos carcinomas. Esses dados sugerem uma relação clonal entre as lesões reafirmando a ideia de que as hiperplasias ductais atípicas são precursores não obrigatórios do carcinoma ductal (MA *et al.*, 2003).

2.1.2 Carcinoma ductal *in situ*

Dando sequência à transformação neoplásica em modelo de etapas que leva ao carcinoma ductal invasor, a lesão que sucede as hiperplasias é o carcinoma ductal *in situ*. Esse é considerado não letal, porém mulheres que portam esse diagnóstico e permanecem sem tratamento apresentam até dez vezes mais chance de desenvolver o carcinoma invasor ipsilateral. Essa lesão é vista como um precursor não obrigatório, uma vez que, ambos compartilham características genéticas e anormalidades moleculares. Apesar disso, não se pode afirmar que todos os carcinomas ductais *in situ* se transformarão em invasores. A falta de um marcador eficiente, capaz de identificar os casos propensos a essa evolução faz com que parte das mulheres seja submetida a um excesso de tratamento (CARRARO; ELIAS; ANDRADE, 2014).

O carcinoma ductal *in situ* é uma lesão não invasora, que consiste em uma proliferação monoclonal de células epiteliais neoplásicas, restritas somente ao interior das UTDLs, e cercada por uma camada intacta de células mioepiteliais (COLEMAN, 2019). A presença dessas células, delimitando essa proliferação, pode ser marcada imuno-histoquimicamente, e assim, auxiliar na identificação de microinvasões (MARDEKIAN; BOMBONATI; PALAZZO, 2016).

O crescimento das células neoplásicas ocorre em diversos padrões e apresentam características citológicas variáveis. Isso faz com que essa lesão receba subclassificações referentes tanto à arquitetura, quanto ao grau nuclear. Os padrões de crescimento mais comuns são: (a) Sólido, onde as células monomórficas crescem coesas, como um lençol, ocupando todo o UTDL e tendem a formar microacinos; (b) Papilar; caracterizada por uma ramificação de um feixe fibrovascular revestido por células epiteliais atípicas; (c) Micropapilar, composto por células que se projetam para o lúmen dos UTDLs, com base estreita, ponta alargada e ausência de feixe fibrovascular; (d) Cribriforme, com as células neoplásicas polarizadas em torno de lúmens secundários arredondados e rígidos (SANATI, 2019).

Outra subclassificação importante, com valor preditivo, é a relacionada ao grau nuclear. Nela o tamanho do núcleo, polarização, presença e tamanho de nucléolos e as figuras mitóticas vão determinar se o carcinoma ductal *in situ* é de baixo grau, grau intermediário ou de alto grau. Carcinomas *in situ* de alto grau são definidos por uma grande proliferação de células epiteliais, altamente pleomórficas e com pouca organização. O núcleo apresenta contornos irregulares, cromatina grossa, nucléolos múltiplos e evidentes. Há um grande número de figuras de mitose e presença frequente de células apoptóticas. É comum observar no centro da proliferação epitelial regiões com necrose calcificada, chamadas de comedo necroses. (ROSS; WEN; BROGI, 2003; SANATI, 2019). Análises genômicas demonstram que deleções de 16q são raras, porém as ocorridas em 8p, 11q, 13q, 17q e 20q são mais frequentes (BADVE; GÖKMEN-POLAR, 2019).

Já os carcinomas ductais *in situ* de baixo grau, são compostos por células pequenas e monomórficas, com núcleos uniformes, arredondados e nucléolos imperceptíveis. As contagens mitóticas são baixas e apenas pequenas calcificações são vistas (ROSS; WEN; BROGI, 2003; SANATI, 2019). Esse é o padrão de lesão que mais se assemelha à hiperplasia ductal atípica, por isso demanda maior atenção ao se fazer o diagnóstico diferencial. O principal ponto que diferencia as duas alterações é o seu tamanho. O carcinoma *in situ* deve preencher toda a UTDL, ou acometer dois ductos adjacentes, ou medir mais de 2 mm. O uso de marcadores imunohistoquímicos para citoqueratinas de alto peso molecular e para ER não são eficazes para distinguir essas duas lesões, uma vez que apresentam padrões de marcação semelhantes. (PINDER; ELLIS, 2003; ROSS; WEN; BROGI, 2003; COLLINS, 2018). Outra semelhança, é que ambas estão associadas à deleção de 16q e ganho de 1q (BADVE; GÖKMEN-POLAR,

2019). Para finalizar, os classificados como de grau intermediário são lesões que podem se enquadrar em tanto em características de alto grau como de baixo grau (SANATI, 2019).

Além das informações fornecidas pelas características morfológicas, análises proteicas e genéticas podem ser realizadas a fim de melhor identificar o carcinoma *in situ*. Dessa forma, técnicas imuno-histoquímicas para marcadores relacionados à proliferação; regulação do ciclo celular; apoptose; angiogênese e inflamação são amplamente utilizados para colaborar na definição do fator prognóstico de cada caso. Os ER e PR, assim como os HER2 também são utilizados e demonstram que, casos negativos para ER são associados a uma maior recorrência do tumor. Essa relação de aumento na recidiva também é observada em casos em que há expressão de HER2 (BADVE; GÖKMEN-POLAR, 2019).

O patologista é profissional responsável em fornecer as informações necessárias para que o prognóstico seja traçado, mas infelizmente ainda há muita divergência de opiniões (HONG *et al.*, 2018). Esse problema é, em grande parte, devido ao fato que ainda não foi descoberto um marcador preciso que diferencie os casos com maior propensão a evoluir para o carcinoma ductal invasor (COLEMAN, 2019).

2.1.3 Carcinoma ductal invasor

Se opondo ao carcinoma ductal *in situ*, o invasor é uma doença com altas taxas de mortalidade e apenas em 2018, foi responsável por mais em 600 mil mortes no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Sendo o ponto final no modelo de transformação em etapas, o carcinoma ductal invasor se diferencia do *in situ* quando as células neoplásicas em proliferação rompem a camada de células mioepiteliais e a membrana basal. Em consequência desse rompimento, essas células podem se espalhar por todo o estroma adjacente, em forma de ninhos, cordões ou até mesmo de células isoladas, conferindo característica de invasão (SHEA; KOH; TAN, 2020).

Os carcinomas ductais invasores são os tumores invasivos de mama mais comuns e representam até 75% dos casos. As células tumorais mostram grande pleomorfismo, com variações de forma e tamanho. Os nucléolos geralmente são evidentes e podem ser observadas inúmeras figuras de mitose. São ainda muito associados a necroses e calcificações (MAKKI, 2015). Eles apresentam grandes variações clínicas, morfológicas, de crescimento tumoral e de expressão de biomarcadores. Desse modo, para que se conheça bem o tumor de cada mulher deve ser feita

uma classificação detalhada do tumor definindo seu grau, estadiamento e perfil molecular (SHEA; KOH; TAN, 2020).

O grau tumoral, um importante fator prognóstico, é determinado microscopicamente através da observação e categorização em escores do pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e formação tubular. A soma desses escores classificará o tumor em: Grau 1, bem diferenciado; Grau 2, moderado e Grau 3, pouco diferenciado. Já o estadiamento é definido utilizando o sistema TNM, assim a lesão pode ser classificada de acordo com sua extensão. Nesse sistema, T, se refere ao tamanho do tumor invasivo; N é atribuído de acordo com o acometimento da cadeia axilar de linfonodos, sendo que essa avaliação é um dos principais pontos para se determinar a necessidade de quimioterapia adjuvante; e M é estabelecido de acordo com a presença ou ausência de metástases distantes (GANNON; COTTER; QUINN, 2013; ELIYATKIN *et al.*, 2015).

Por fim, classificar os tumores de acordo com a expressão imuno-histoquímica de HER2, PR e ER contribui para o prognóstico e auxilia na seleção de pacientes com potencial responsivo à terapia hormonal (MORI; YANG; KAKUDO, 2002). Os ER estão presentes em aproximadamente 70% dos tumores. Quando são estimulados promovem o crescimento do epitélio da mama, porém são associados a um bom prognóstico, uma vez historicamente que são bons responsivos às terapias hormonais (HARVEY *et al.*, 1999), como tamoxifeno e inibidores de aromatase. Os PR desempenham o mesmo papel e quando sua presença está associada ao ER há uma melhora na resposta a essas terapias. Já o HER2 é um receptor de fator de crescimento que está associado a uma piora no prognóstico. Apesar disso, tumores com presença dessa proteína são bons responsivos a trastuzumabe e lapatinibe. Outro marcador que atua como fator prognóstico e auxilia na determinação do perfil molecular no carcinoma invasor é o Ki67, um antígeno nuclear presente em todas as fases do ciclo celular e ausente nas células em repouso. Dado essa característica, é amplamente utilizado para medir a taxa de proliferação celular. As orientações para que essa taxa seja definida é avaliar a marcação em no mínimo 500 células neoplásicas, assim a porcentagem de células marcadas em relação às avaliadas é estabelecida como o escore do Ki67 (GANNON; COTTER; QUINN, 2013). O ponto de corte em que se define se a lesão apresenta alto ou baixo índice proliferativo é o de 14% de células marcadas para esse antígeno (CHEANG *et al.*, 2009).

Realizado a caracterização molecular do tumor, esse pode ser segregado em: (a) Luminal A, onde há positividade para ER e PR, sem marcação para HER2 e baixas taxas proliferativas.

Esses tumores têm bom prognóstico, geralmente são de baixo grau histológico e apresentam menores chances de recorrência. Devido à alta expressão de receptores hormonais, as pacientes normalmente são direcionadas ao tratamento com inibidores de aromatases. (b) Luminal B, também são tumores positivos para ER e PR, mas podem ou não ter marcação para HER2. A grande diferença é que apresentam altas taxas de proliferação celular, fazendo com que sejam mais agressivos do que os Luminais A. Pacientes desse grupo também fazem uso de terapias hormonais, mas podem ainda responder a quimioterapia neoadjuvante. (c) HER2 positivo, são carcinomas negativos para receptores hormonais e positivos para HER2. Geralmente associados a tumores de alto grau, agressivos, mas bons responsivos a quimioterapias. (d) Triplo negativo, são caracterizados por negatividade para os três marcados e altas taxas proliferativas. Esses tendem a ser agressivos, tem respostas variáveis à quimioterapia e por isso apresentam pior prognóstico (GANNON; COTTER; QUINN, 2013).

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

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VGCC – *voltage-gated calcium channel*) são proteínas transmembrana que se abrem em resposta a uma despolarização na membrana celular, permitindo assim, o influxo dos íons Ca^{2+} e o equilíbrio do gradiente eletroquímico. Geralmente são encontrados em células excitáveis, onde há geração de potencial de ação e consequente despolarização da membrana, desempenhando um papel crucial nessas células. No músculo cardíaco, liso e esquelético, a abertura dos VGCCs leva a contração muscular e regula a força dessa contração. Em algumas células endócrinas, a entrada de Ca^{2+} através deles inicia a secreção hormonal e dá início a transmissão sináptica nos neurónios (CATTERALL, 2011).

Apesar de associados às células excitáveis sua presença já foi identificada em outros tipos celulares, como linfócitos T, osteoblastos, algumas células epiteliais e até mesmo em células tumorais (WANG *et al.*, 2015; PITT; MATSUI; CAO, 2021). Como essas células não apresentam maquinário para gerar um potencial de ação, para abertura dos VGCC, a despolarização na membrana ocorre de outra forma, geralmente através de estímulos que agem primeiro em outros canais. Como por exemplo, a abertura do receptor de inositol trifosfato a partir de um estímulo externo, como fatores de crescimento, leva ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular. Isso vai levar a abertura de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} , resultando em um efluxo de K^+ e consequentemente hiperpolarização da membrana. Essa hiperpolarização vai garantir que a grande maioria dos canais se encontre em estado fechado, e consequentemente

disponíveis para serem abertos quando a despolarização ocorrer (GRAY; SCHIFF; MACDONALD, 2012).

Há uma variedade de subtipos de VGCCs, que são primeiramente divididos em dois grandes grupos de acordo com suas características eletrofisiológicas, sendo: canais ativado por alta voltagem (HVA – *high voltage-activated*), ou seja, demandam grandes despolarizações de membrana para serem abertos; e canais ativado por baixa voltagem (LVA – *low voltage-activated*), que são ativados por pequenas mudanças na voltagem. Todos têm seu poro formado pela subunidade α_1 . Porém apenas os inseridos no grupo dos HVA apresentam ainda as subunidades auxiliares β , $\alpha_2\delta$ e por vezes a subunidade γ , que contribuem na modulação da abertura do canal e na regulação do seu tráfego entre os compartimentos intracelulares. A subunidade α_1 é a principal responsável pela classificação dos variados subtipos de VGCCs, uma vez que pode ser codificada por 10 genes diferentes, onde cada um deles corresponde a uma isoforma. Partindo disso, existem três famílias principais de VGCC, Cav1, Cav2 e Cav3. Os Cav1 compreendem 4 isoformas, Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4 (codificados por CACNA1S, -C, -D e -F, respectivamente) e são conhecidos como canais do tipo L. Os Cav2 são divididos em Cav2.1 (CACNA1A), canais do tipo P e Q; Cav2.2 (CACNA1B) canais do tipo N; e Cav2.3 (CACNA1E) canais do tipo R. Por fim, a família dos Cav3 é formada por Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3 (CACNA1G, -H e -I, respectivamente) e ganham o nome de canais do tipo T (SIMMS; ZAMPONI, 2014; DOLPHIN, 2016). Até o momento, apenas a família dos Cav2 é expressa exclusivamente em células excitáveis (PITT; MATSUI; CAO, 2021).

2.2.1 Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (LTCC – *L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels*), como dito anteriormente, fazem parte dos HVA e possuem 4 isoformas (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4). Nos tecidos, as isoformas Cav1.1 e Cav1.4 são mais limitadas a certas regiões, quando comparado as demais isoformas. O Cav1.1 é expresso principalmente no músculo esquelético, tendo papel crucial na contração muscular, enquanto o Cav1.4 tem expressão mais restrita na retina, sendo necessário para a função normal da visão. Já Cav1.2 e Cav1.3 estão geralmente presentes nos mesmos tecidos, entre eles: no cérebro, participando de diferentes formas na aprendizagem, memória e ansiedade; nas células endócrinas, estando envolvidos com a secreção hormonal; e no coração, sendo essenciais para manter o ritmo cardíaco (CATTERALL, 2011; DOLPHIN, 2016).

Alterações na expressão e na função dos LTCC são responsáveis por algumas patologias que estão relacionadas com as principais funções e localizações desses canais. Entre elas estão a síndrome de Timothy, a doença de Parkinson, algumas doenças neuropsiquiátricas e disfunções cardíacas (ZAMPONI *et al.*, 2015). Porém, além dessas manifestações clássicas, há indícios de que as isoformas Cav1.1, Cav1.2 e Cav1.3 têm relação com alguns tumores, uma vez que se encontram com alterações da expressão de RNAm, quando comparados com o tecido não neoplásico correspondente. Ressaltando ainda que em alguns tumores os canais se mostravam superexpressos, enquanto diminuídos em outros, indicando que as alterações têm relação direta com o tipo celular. Apesar disso, não está claro os mecanismos e processos que esses canais podem influenciar nas células neoplásicas. A participação dos Cav1.4 é ainda mais desconhecida e sua expressão foi raramente observada em neoplasias (WANG *et al.*, 2015; BUCHANAN; MCCLOSKEY, 2016; PHAN *et al.*, 2017).

Entre os tumores que apresentam alterações da expressão de LTCC estão as neoplasias de mama, que mostraram superexpressar o gene responsável por codificar a subunidade α_1 de Cav1.2 e Cav1.3 (WANG *et al.*, 2015; PHAN *et al.*, 2017). Além disso, sua presença já foi associada com a invasão, migração e até mesmo com a proliferação de células tumorais de mama (GARIB *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2015; JACQUEMET *et al.*, 2016). Inclusive, já foi sugerido que tumores de mama com amplificação na região cromossômica responsável por codificar a subunidade γ tem maiores chances de desenvolver metástases. Isso devido ao fato dessa subunidade regular a abertura do canal, mantendo-o fechado e conseqüentemente resultando em baixo Ca^{2+} intracelular e levando ao desenvolvimento de funções que levem a metástase (KANWAR *et al.*, 2020).

2.2.2 Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo T

Já os canais do tipo T, diferente dos LTCC não apresentam nenhuma das subunidades auxiliares, e fazem parte dos LVA, demandando uma pequena diferença de potencial para serem ativados. Somado a isso, estes canais apresentam uma sobreposição entre a dependência de voltagem para a ativação e inativação estacionárias gerando um influxo de cálcio que é denominado de corrente de “janela”. Essa corrente aparece em potenciais próximos ao potencial de repouso promovendo uma despolarização da membrana e um influxo de Ca^{2+} em condições de repouso ou não-estimuladas (WEISS; ZAMPONI, 2019). Quanto a função e a localização nos tecidos, as três isoformas de Cav3 apresentam papel na excitabilidade neuronal, também

contribuem com a atividade do marcapasso cardíaco, do sistema renina angiotensina e da secreção de aldosterona (CATTERALL, 2011; DOLPHIN, 2016).

Assim como os LTCC, os canais do tipo T também têm relação com algumas patologias, como a epilepsia, distúrbios convulsivos, autismo, hiperaldosteronismo, além de ansiedade elevada e memória prejudicada (ZAMPONI *et al.*, 2015). De forma semelhante, esses canais também vêm sendo relacionados a tumores, tendo sua expressão de RNAm alterada em diversas neoplasias quando comparadas com sua expressão em tecido sem alteração. Como dito anteriormente, a alteração do canal vai ter relação direta com o tipo celular e somado a isso, os genes de α_1 podem sofrer *splicing* alternativos gerando uma grande variedade de subtipos de canais com diferentes condutâncias e expressões, e conseqüentemente diferentes funções (PHAN *et al.*, 2017; ANTAL; MARTIN-CARABALLO, 2019).

As neoplasias de mama fazem parte dos tumores que apresentaram alterações da expressão dos canais do tipo T, porém com resultados controversos em diferentes estudos de meta-análise. Tanto a isoforma Cav3.1, quanto a Cav3.3 se mostraram superexpressas em um dos trabalhos e diminuída em outro. Com destaque para a Cav3.1, que apresentou diferença de expressão ao se comparar diferentes tipos histológicos de neoplasias de mama, com superexpressão em carcinomas lobulares invasores, uma classificação histológica sabidamente mais agressiva. Já Cav3.2 foi observada no tumor de mama em apenas um dos trabalhos, e com diminuição de expressão quando comparada ao epitélio de mama sem alteração (WANG *et al.*, 2015; PHAN *et al.*, 2017). Somado a isso, alguns estudos que trabalharam com o silenciamento e com o bloqueio dos canais do tipo T indicaram redução da proliferação e indução de morte em células de linhagem de tumor de mama (BERTOLESI *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2008; BASSON *et al.*, 2015). Por outro lado, também há indícios de que a isoforma Cav3.1 possa ser considerada um gene supressor de tumor, uma vez que seu silenciamento aumenta a proliferação e diminui o número de apoptose em células MCF-7 (OHKUBO; YAMAZAKI, 2012).

2.3 Alterações proliferativas e sua relação com canais de Ca^{2+}

As hiperplasias ductais e os carcinomas ductais são consideradas lesões proliferativas da mama, justamente por apresentarem alterações no processo de multiplicação celular. Além disso, alterações no ciclo celular tem papel importante nos processos de transformação dessas lesões, uma vez que aquelas com taxas proliferativas mais elevadas têm um maior risco de malignização (SANTISTEBAN *et al.*, 2010; SHAABAN *et al.*, 2002).

A proliferação celular é o resultado final do ciclo de divisão celular, processo altamente controlado para garantir a duplicação do genoma e a segregação dos cromossomos replicados em duas células-filha (MATSON; COOK, 2017). A regulação de todos os processos envolvidos no ciclo celular ocorre de forma controlada e organizada por inúmeros fatores de crescimento, ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (LEAL-ESTABAN; FAJAS, 2020; WENZEL; SINGH, 2018).

Além dos citados acima como participantes da regulação do ciclo celular, e conseqüentemente da proliferação, os íons cálcio também estão incluídos como responsáveis pela modulação desses processos. O Ca^{2+} intracelular atua como um segundo mensageiro pleiotrópico e sua elevação gera um sinal que é modificado e decodificado por proteínas de ligação ao Ca^{2+} , que podem modular a duração e a localização dos sinais gerados. Além disso, podem também atuar a partir de proteínas, como a calmodulina, que atua traduzindo os sinais de Ca^{2+} em efeitos celulares ou podem se ligar a proteína quinase C, ativando-a e permitindo que essa fosforile proteínas celulares (LEE; MONTEITH; ROBERTS-THOMSON, 2006). Sendo um processo complexo, a sinalização de Ca^{2+} pode variar de diversas formas, como em suas características espaciais e temporais. Como por exemplo, grandes aumentos sustentados desse íon podem levar a morte das células, enquanto alterações localizadas podem modular a sua migração (MONTEITH; PREVARSKAYA; ROBERTS-THOMSON, 2017). Com isso, o Ca^{2+} intracelular tem a capacidade de regular diferentes funções, como fertilização de oócitos, senescência replicativa, diferenciação, proliferação e morte celular (HUMEAU *et al.*, 2018; MARTIN; BERNARD, 2018).

Diferente da maioria dos demais sinalizadores celulares, o Ca^{2+} não é criado a partir de uma reação enzimática, nem destruído ou convertido em um metabolito inativo, por isso, sua sinalização é derivada de depósitos internos ou do meio externo. Em função disso, canais, bombas ou trocadores desse íon são responsáveis por controlar sua homeostase no citoplasma e nas organelas. Quando vindo do meio extracelular, diferentes canais iônicos na membrana plasmática controlam sua entrada, que geralmente é facilitada devido a grande diferença de concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma (aproximadamente 100 nM) e no meio extracelular (>1 mM). Esses transportadores, como os canais dependentes de voltagem, operados por receptor e membros da família de canais iônicos potencial receptor transiente (TRP) pode responder a estímulos como despolarização da membrana, estímulos nocivos, agonistas extracelulares e a depleção dos estoques intracelulares. Quando a origem do Ca^{2+} são dos

depósitos internos, seu efluxo é controlado por alguns mensageiros (o próprio íon, Inositol trifosfato e ADP ribose cíclico) que modulam os receptores de Inositol trifosfato e receptores de Rianodina, os principais canais localizados na membrana dos depósitos intracelulares (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; LEE; MONTEITH; ROBERTS-THOMSON, 2006; MONTEITH; PREVARSKAYA; ROBERTS-THOMSON, 2017).

Portanto, dada a importância do íon cálcio para as funções celulares e que sua sinalização depende de seus transportadores, ressalta-se a relevância dos canais de Ca^{2+} em diferentes processos metabólicos celulares. Além disso, há indícios que a expressão desses canais pode ser mais importante do que a entrada de cálcio para controlar a proliferação celular (CAPIOD, 2013; CAPIOD, 2016). Isso foi visto a partir de experimentos que demonstravam que a taxa de proliferação celular em células HeLa e em células de hepatoma humano não foi afetada por concentrações extracelulares de cálcio muito baixas (abaixo de $10 \mu\text{M}$), porém foi sensível a alterações na expressão de ORAI1 e ORAI3, outra classificação de canais de Ca^{2+} (BOROWIEC *et al.*, 2004). Fortalecendo essa ideia, em células MCF-7, o silenciamento de ORAI3 foi mais eficaz em reduzir a proliferação do que a retirada do cálcio extracelular (FAOUZI *et al.*, 2010). Devido a isso, tem sido sugerido, além da condução de íons, que os canais de cálcio apresentem outras funções, como a modulação de vias intracelulares através das proteínas dos canais ou seu acoplamento a outras proteínas, levando a regulação da transcrição de genes. Exemplos disso, os canais de cálcio TRP, que contêm um domínio quinase funcional, e aos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, onde uma de suas regiões pode controlar a transcrição gênica (ARCANGELI *et al.*, 2009). Além disso, esses canais demonstram ter influência direta na proliferação, a partir de interações com proteínas do ciclo celular. Sendo demonstrado que os receptores de Inositol Trifosfato estão fisicamente acoplados a Cdc2/cíclica B1 em células Jurkat, linhagem de linfócitos T derivada da leucemia/linfoma de células T do adulto (CAPIOD, 2011).

Voltando para o papel do Ca^{2+} na proliferação, acredita-se que ele seja capaz de regular o ciclo celular de diferentes maneiras, atuando no fuso mitótico e na citocinese. Além disso, é capaz de modular a expressão e a atividade dos fatores de transcrição responsáveis por controlar a expressão de ciclinas. Podendo também, produzir efeito direto nas ciclinas, nas quinases dependentes de ciclinas e nas proteínas associadas, tendo relação com a passagem das células pelos pontos de checagem do ciclo celular. Ressaltando que essas ações não dependem apenas da elevação de Ca^{2+} intracelular, mas também relacionadas com a duração das ondas de cálcio.

Visto isso, muitos canais de cálcio estão presentes no ciclo celular, promovendo a sinalização necessária para que esse processo ocorra, como os canais de cálcio dependentes de voltagem, presentes nas fases G0, S e G2 (BECCHETTI, 2011; ROSENDO-PINEDA; MORENO; VACA, 2020).

Portanto, qualquer alteração sofrida nos canais de cálcio, como mutações, mudanças no nível de expressão, ou até mesmo na sua localização subcelular poderá levar a modificações na concentração desse íon nos diferentes compartimentos celulares, levando a alterações na sinalização e conseqüentemente na desregulação de funções celulares (DELIOT; CONSTANTIN, 2015). Isso poderá desencadear uma mudança do perfil celular contribuindo para o desenvolvimento de uma célula com características malignas (MONTEITH *et al.*, 2007).

Essa relação foi observada em trabalhos que estudaram variados tipos de canais e tumores com resultados heterogêneos. Foi verificado que o aumento de expressão de ORAI1 promove oscilações de Ca^{2+} e ativação de vias proliferativas em células de carcinoma espinocelular esofágico (ZHU *et al.*, 2014). Assim como o aumento de uma subunidade do canal de Ca^{2+} do tipo T estar envolvida no aumento de proliferação em astrocitomas humano (PANNER *et al.*, 2005). Além disso, o aumento do número de cópias da região do gene responsável por codificar TRPV6 é uma característica comum em tumores de mama triplo-negativos (PETERS *et al.*, 2012).

Por outro lado, demonstrando a variedade nos resultados, a diminuição ou o bloqueio da expressão de alguns canais também já foi associada às neoplasias, como em tumores de próstata que estão em transição para um fenótipo refratário a hormônios, e apresentam uma regulação negativa de ORAI1, sendo relacionados com proteção as vias indutoras de apoptose (FLOURAKIS *et al.*, 2010). Em células neoplásicas de próstata, também já foi visto que a inibição farmacológica dos canais dependentes de voltagem do tipo L suprime sua proliferação (CHEN *et al.*, 2014). Além disso, mudanças na expressão desses canais podem estar relacionadas ao início do desenvolvimento de neoplasias, já sendo demonstrado que a carcinogênese de carcinomas de cólon tem relação com a diminuição da expressão de SERCA3 (BROULAND *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar e comparar a expressão proteica dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, do tipo L e do tipo T, em epitélio sem alterações, hiperplasias ductais e carcinomas ductais *in situ* e invasores da mama humana.

3.2 Específicos

- Classificar, de acordo com os critérios histopatológicos humanos, regiões de hiperplasias ductais, de carcinomas ductais *in situ* e de carcinomas ductais invasores da mama.
- Determinar a expressão imuno-histoquímica de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (Cav1.1, Cav1.2 e Cav1.3) e do tipo T (Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3) em glândula mamária sem alteração, hiperplasias ductais, carcinomas ductais *in situ* e carcinomas ductais invasores mamários.
- Comparar e correlacionar as expressões imuno-histoquímica de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4) e do tipo T (Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3) em hiperplasias ductais, de carcinomas ductais *in situ* e de carcinomas ductais invasores da mama.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de material humano como fonte primária de informação e após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (CAAE: 33481919.4.0000.5149 e 33481919.4.3001.5138, respectivamente).

4.2 Espécimes

Foram analisadas 56 amostras de mama humana, armazenadas em blocos de parafina, oriundas do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, coletadas entre 2010 a 2015. As amostras recebidas pelo o Laboratório de Comportamento Celular foram destinadas somente para pesquisa e divulgação científica sem fins comerciais ou divulgação de dados clínicos das pacientes.

4.3 Avaliação Histopatológica

Amostras histológicas de mama humana, coradas pela técnica de hematoxilina-eosina, foram analisadas em microscopia ótica para classificação das regiões em: epitélio mamário sem alteração; Hiperplasia ductal; Carcinoma ductal *in situ*; Carcinoma ductal invasor, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (GOBBI, 2012). Cada amostra analisada que contivesse mais de uma lesão, além de epitélio mamário sem alteração, foi classificada e analisada individualmente.

4.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (*Novocastra Post Primary* e *Novolink Polymer*; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido pressurizado a 137°C (Autoclave ALT 5LD plus; ALT, São Paulo, Brasil) com *Target Retrieval Solution Citrate – low pH* (Agilent Technologies, California, US). Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por dois tempos de 5 minutos em *Novocastra Peroxidase Block* (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). Para bloquear as proteínas endógenas a incubação foi de 15 minutos em *Novocastra Protein Block* (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo

de incubação do anticorpo primário de 16 horas e do cromógeno 3'3-diaminobenzidina *Novocastra DAB Chromogen + Novocastra DAB Substrate Buffer* (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK), de 1 minuto. Após a incubação no DAB os cortes foram contracolorados com Hematoxilina. Para controle positivo foram utilizados tecidos que sabidamente expressam a proteína em questão e para controle negativo, a etapa de incubação do anticorpo primário foi substituída pela incubação com imunoglobulinas correspondentes a espécie que os anticorpos primários foram produzidos. No quadro 1 estão identificados os anticorpos utilizados, assim como o tecido usado como controle positivo e as espécies das imunoglobulinas referentes aos controles negativos.

Quadro 1 – Anticorpos primários e seus respectivos fabricantes, clones, diluições, controles positivo e tipo de soro utilizado nos controles negativos.

	Fabricante	Clone	Diluição	Controle positivo	Soro do controle negativo
Cav1.1	Santa Cruz Biotechnology	G-1	1:50	Músculo esquelético humano	Coelho
Cav1.2	Santa Cruz Biotechnology	D-6	1:50	Músculo liso humano	Coelho
Cav1.3	Santa Cruz Biotechnology	E-3	1:150	Coração de camundongo	Coelho
Cav3.1	Alomone	Policlonal	1:250	Músculo esquelético humano	Camundongo
Cav3.2	Alomone	Policlonal	1:100	Músculo esquelético humano	Camundongo
Cav3.3	Alomone	Policlonal	1:200	Cérebro humano	Camundongo

Fonte: elaborada pelo autor.

4.5 Interpretação da Imuno-histoquímica

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em objetiva de 400 (Olympus – BX41). Cada uma das amostras teve suas regiões analisadas de forma semiquantitativa quanto a marcação membranar, citoplasmática e nuclear para todos os anticorpos mencionados anteriormente.

Para análise da imunexpressão membranar foi adotado um escore que categorizava as células de acordo com o percentual que apresentava essa marcação, onde: 0 (ausência de marcação); 1+ (<25%); 2+ (25% - 50%); 3+ (>50%). Para a expressão citoplasmática a categorização foi realizada de acordo com a intensidade de expressão, seguindo o escore: 0: ausência de marcação; 1+: fraca; 2+: moderada; 3+: forte. Por fim, para a expressão nuclear foi inicialmente estimado o percentual de células que apresentavam ausência de marcação, marcação fraca, moderada ou forte. Em seguida, esses dados foram segregados em: expressão negativa, considerando o somatório dos percentuais de células com ausência de marcação e marcação fraca; expressão positiva, sendo esse o somatório dos percentuais em que houve marcação moderada ou forte. A estimativa dos percentuais foi ainda classificada de acordo com a intensidade de expressão predominante, onde: 0: ausência de marcação; 1+: marcação fraca; 2+: marcação moderada; 3+: marcação forte.

4.6 Análise Estatística

As possíveis correlações foram avaliadas pelo Teste de Pearson e foram consideradas como significativas os resultados cuja probabilidade de significância do teste foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de um artigo e uma *short communication* que se encontram nas normas dos respectivos periódicos a que serão submetidos.

Artigo: T-type Ca²⁺ channels and their relationship with pre-neoplastic and neoplastic lesions in the human breast

Este trabalho será submetido à revista *Breast Cancer Research and Treatment*, que possui Qualis CAPES A2 na área de avaliação Medicina II e fator de impacto de 3,940.

Short communication: Identification of L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels involved in pre-neoplastic transformation of breast cancer

Este trabalho será submetido à revista *Histochemistry and Cell Biology*, que possui Qualis CAPES B1 na área de avaliação Medicina II e fator de impacto de 3,418.

5.1 Artigo

T-type Ca²⁺ channels and their relationship with pre-neoplastic and neoplastic lesions in the human breast

Flávia Aguiar¹; Paula Rhana²; Enrrico Bloise³; Cristiana Buzelin⁴; Jader S. Cruz²; Andreia Laura Rodrigues⁵; Enio Ferreira¹.

¹ Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

² Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

³ Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Department of Pathological Anatomy, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author: Prof Dr Enio Ferreira. Email: enioferreira@ufmg.br

Abstract

Purpose: The T-type voltage-dependent Ca²⁺ channels have already been seen altered in breast tumours, but their expression and subcellular localization has not been evaluated in lesions with pre-neoplastic characteristics. Therefore, this work evaluated the protein expression and the subcellular localization of the isoforms of T-type channels in human breast tissue samples.

Methods: In the present study, protein expression of Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3 were evaluated by immunohistochemistry in breast without alteration and in proliferative non-neoplastic and neoplastic ductal epithelial lesions of the human breast.

Results: A reduction in nuclear Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3 expression was observed in advanced stages of neoplastic transformation, added to an increase cytoplasmic expression of Cav3.1 and Cav3.2. Also, the reduction in nuclear expression was correlated with an increase in cytoplasmic expression for the Cav3.1 isoform.

Conclusions: The change observed in Cav3 protein expression and subcellular localization coincides with the stages of neoplastic transformation in mammary epithelial cells, evident in early neoplastic lesions, such as ductal carcinomas *in situ*. These results suggest a possible involvement of the T-type voltage-dependent Ca²⁺ channels (Cav3) sub-family in the carcinogenic processes and could be considered a potential pharmacologic target in new therapies for breast cancer treatment.

Keywords: Breast cancer; Ductal hyperplasia; Carcinoma *in situ*; T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel; Cav3; Neoplastic transformation.

Declarations

Fundings

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG #10274/16 e #00056/15 grants to Jader S. Cruz). Flávia Aguiar and Paula Rhana hold a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Conflicts of interest/competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and material

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors contributions

Conception and study design: F.A., A.L.R. and E.F.; case selection: F.A., E.B.; C.B.; E.F.; sample processing and experiments: F.A.; data analysis and interpretation: F.A.; P.R.; A.L.R.; J.S.C.; E.F.; wrote the manuscript: F.A.; E.F.. All authors read and approved the final manuscript.

Introduction

Among the various types of tumours, breast cancer is considered to have the highest incidence between women, besides being responsible for the largest number of deaths caused by cancer in this part of the population, accounting 627,000 deaths in 2018 [1]. The high adaptive capacity of tumour cells to different types of chemotherapy, aggressive metastasis, as well as late detection, are some factors for the high mortality rates [2]. Another problem when dealing with breast cancer is that it is a heterogeneous disease, which comprises distinct histological and biological features, leading to a variety of clinical presentations and behaviours, as well as responses to the available therapy [3].

The most common subtype of breast cancer is the invasive ductal carcinoma (IDC) [4]. Historically, neoplastic transformation for this subtype has been traced as a model steps, like the Vogelstein model [5] for colon cancer. The first step usually is usual ductal hyperplasia that can transform to atypical hyperplasia, being transformed into ductal carcinoma *in situ* (DCIS), and finally, IDC. Although these lesions are considered possible non-obligate precursors for invasive ductal carcinoma [6,7], the lack of an efficient marker, capable of identifying the cases prone to this evolution, exposures women to an excess of treatment [8,9].

It is well established the increased risk that non-obligate precursors present for the development of breast ductal carcinoma. Patients diagnosed with usual hyperplasia are twice as likely to develop IDC, while those with atypical hyperplasia are four to five-fold more likely to have this transformation [10–12]. Women diagnosed with DCIS, and remain untreated, have this outcome increased by ten-fold [9]. In addition, these lesions also have in common an increased number of epithelial cells due to changes in proliferation [13–15]. Changes in this cellular process are known to be closely related to greater probability of transformation, since lesions with high proliferative rates are more likely to develop malignancy when compared to those with lower rates [16,17].

One of the regulatory mechanisms for cell proliferation is controlled by intracellular Ca^{2+} levels, a very important and ubiquitous intracellular second messenger related with several functions, as proliferation, cell cycle, apoptosis, gene transcription and migration [18,19]. Ca^{2+} signalling at the tumour can contribute to reach a favourable tumour microenvironment, with the uncontrolled production of growth factors, changes in pH, hypoxia and angiogenesis. Ca^{2+} can also modulate tumour invasion and migration and it is crucial in the stages of cell cycle [20]. Therefore, imbalances in the Ca^{2+} homeostasis can trigger important changes in cellular profile contributing to the development of cells with malignant features [21].

Different types of Ca^{2+} channels, exchangers and pumps are important to control intracellular Ca^{2+} concentration. Voltage-dependent ion channels are commonly associated to excitable cells, but the expression of T-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (Ca_v3) has been reported in various types of non-excitable cells, including breast. Ca_v3 are membrane proteins formed by $\alpha 1$ subunit, which can be encoded by different genes (CACNA1G; CACNA1H; CACNA1I), resulting into three different protein isoforms, $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ and $\text{Ca}_v3.3$, respectively [22,23].

mRNA expression of Ca_v3 in breast tumours is still poorly understood. It has been reported an increased expression of $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.3$ [24], but also a reduction of $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ [25] expression in invasive mammary carcinoma tissues. One possible reason for these discrepancies may be related to the non-separation of different histological types of breast cancer which have different characteristics of development and progression [24,25].

There is evidence that blocking Cav3 channels in MCF-7 cells induce cell death [26]. Silencing Cav3.1 and Cav3.2 can lead to decreased proliferation rate [27], demonstrating a possible role in the control of cell proliferation. Corroborating this idea, a study carried out on MCF-7 cells, using extracellular pressure to simulate the role exerted by the stroma in tumours, showed that Ca²⁺ influx mediated by Cav3.3 recruited pathways that stimulates cell proliferation [28]. On the other hand, silencing and/or blocking of Cav3.1 in MCF-7 cells increased proliferation and decreased the number of cells in apoptosis, suggesting a possible function as tumour suppressor gene [29,30].

These differences between previous work indicate that Cav3 may exert a role in tumorigenesis and that their signalling pathways still need to be further investigated. Furthermore, the behaviour of Cav3 protein in the breast epithelium without alteration (BWA) and in proliferative non-neoplastic and neoplastic ductal epithelial lesions of the human breast were not investigated yet. These analyses can provide preliminary information on the role of Cav3 in tumour transformation of breast cancer from pre-neoplastic and neoplastic lesions. Therefore, this study aimed to analyse protein expression and subcellular localization of Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3 in tissues from BWA, ductal hyperplasia (DH), DCIS and IDC.

Methods

Ethical issues

This work was carried following the ethical principles for the use of human material as a primary source of information after approval by the Research Ethics Committee (*Comitê de Ética em Pesquisa – COEP*) of the Federal University of Minas Gerais and of the *Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte* (33481919.4.0000.5149 and 33481919.4.3001.5138, respectively).

Histopathological evaluation

56 samples of human breast stored in paraffin blocks from Hospital Santa Casa de Misericordia de Belo Horizonte were analysed. These samples were collected between 2010 and 2015. Histological samples of human breast, stained with hematoxylin-eosin, were analysed under light optical microscopy for classification into breast without alteration (BWA); ductal hyperplasia (DH); ductal carcinoma *in situ* (DISC); invasive ductal carcinoma (IDC), according to the guidelines of the World Health Organization [31]. Regions were classified and analysed individually, because samples of one individual may contain several lesions in addition to the normal mammary epithelium.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using the peroxidase reaction technique with identification from polymerized secondary antibody (Novocastra Post Primary and Novolink Polymer; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). The antigen retrieval was performed by pressurized humid heat at 137°C (Autoclave ALT 5LD plus; ALT, São Paulo, Brazil) with Target Retrieval Solution Citrate - low pH (Agilent Technologies, California, US). Blockage of endogenous peroxidase and endogenous proteins was done with Novocastra reagents (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). Antibodies anti-Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3 (Polyclonal, Alomone Labs) were used in dilutions of 1: 250, 1: 100 and 1: 200, respectively. Incubation time for primary antibody was set at 16 h and the 3'3'-diaminobenzidine chromogen Novocastra DAB Chromogen (Leica Biosystems, Newcastle upon

Tyne, UK) at 1 min. Sections were counterstained with hematoxylin. For positive controls of Cav3.1 and Cav3.2 markings, we used samples of human skeletal muscle and for Cav3.3 samples of human brain. For negative controls, primary antibody incubation step was replaced by incubation with immunoglobulins of the same species as the primary antibody was produced.

Interpretation of Immunohistochemistry Findings

For statistical purposes, the regions previously classified were categorized into scores, being: BWA (1); DH (2); DCIS (3); IDC (4). All histological analysis were performed using conventional optical microscopy, using a 40x objective (Olympus - BX41). Some samples were excluded for certain markers because they do not show immunohistochemical reactivity.

Membrane, cytoplasmic and nuclear immunohistochemical staining was analysed for each of the antibodies used. Membrane expression was classified by the percentage of cells that had immunoreaction and followed the score: 0 (absence), 1+ (<25%), 2+ (25% - 50%) and 3+ (> 50%). Cytoplasmic staining was analysed according to intensity of expression, using the following score: 0 (absence), 1+ (weak), 2+ (moderate) and 3+ (strong). In the analysis of nuclear expression, the percentage of stained cells with weak, moderate, or strong intensity expression was determined. Secondly, the data were separated into two groups: negative expression, encompassing the sum of the percentage of cells with absence of expression and weak intensity; and positive expression, encompassing the cells with moderate and strong intensity. Also, the predominant percentage of cells with nuclear stain was determined, considering: 0: absence; 1+: weak; 2+: moderate; 3+: strong.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and possible correlations were assessed using Pearson's test. Results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Histopathological analysis was conducted in 56 different cases, where different regions were analysed and classified regarding the types of lesions found in each one of the samples. Were analysed 11 regions of BWA, being considered only those with two or more mammary lobes without histological alterations (**Fig. 1a**). DH were considered when at least two ductal regions presented formation of three or more layers of epithelial cells above the basal membrane and may be formation of intraductal projections, with no distinction of nuclear alterations and with a predominance of nuclear monomorphism (**Fig. 1b**), accounting a total of 18 regions for analysis. 15 regions of DCIS were selected, being considered the presence of epithelial cell proliferation with discrete to moderate nuclear pleomorphism and evident nucleoli, forming intraductal projections or solid masses restricted to the terminal ductal lobular units and surrounded by a myoepithelial cell layer (**Fig. 1c**). IDC were identified in 24 regions, being evaluated areas with atypical epithelial proliferation, creating isolated cell nests in the mammary stroma, with the presence of moderate to high nuclear pleomorphism and a high number of mitosis figures (**Fig. 1d**).

Immunohistochemical staining of Cav3.1 (**Fig. 2**) showed in correlation analysis a negative relationship between the predominant nuclear expression and the histological classification categorization score ($r = -0.73$; $p < 0.05$)

(**Table 1**). Regarding the analysis of cytoplasmic expression, most cases of BWA (87.5%; 7/8) and DH (80.0%; 8/10) did not present this expression, except for one case of BWA (12.5%; 1/8) with weak expression, and two of DH (20.0%; 2/10) with moderate cytoplasmic expression. However, DCIS presented a different pattern, with a greater number of cases with weak cytoplasmic intensity (60.0%; 6/10) and only one (10.0%; 1/10) with moderate. Similar to this, IDC presented cases between weak (31.5%; 6/19) and moderate (42.1%; 8/19) (**Table 2**). In line with these data, correlation shown a positive relationship between cytoplasmic expression and the histological classification categorization score ($r = 0.49$; $p < 0.05$) and a negative correlation between the predominant nuclear expression and the cytoplasmic expression ($r = -0.42$; $p < 0.05$) (**Table 1**).

In Cav3.2 immunohistochemical analysis (**Fig. 3**) a negative relationship was seen with the predominant nuclear expression and the histological classification categorization score ($r = -0.41$; $p < 0.05$) (**Table 3**). Concerning the cytoplasmic expression of Cav3.2, it was observed that all histological classifications analysed had the presence of immunostaining. With a predominance of low-intensity expression for all cases (DH: 75.0%; 12/16, DISC: 76.9%; 10/13, IDC: 59.0%; 13/22), the emphasis was on BWA, where all regions were classified in this score (100.0%; 9/9). For DH, some cases were also seen with an absence of expression (12.5%; 2/16) and with moderate intensity (12.5 %; 2/16). At DCIS, moderate staining was also seen (23.0%; 3/13). In IDC, the number of regions between weak and moderate intensity (59.0%; 13/22 and 36.3%; 8/22, respectively) was more distributed when compared to other type of lesions, also having a case with absence of expression (4.54 %; 1/22) (**Table 4**). Corroborating with these data, a positive correlation was seen between cytoplasmic expression for Cav3.2 and the histological classification categorization score ($r = 0.28$; $p < 0.05$) (**Table 3**).

Analysis of Cav3.3 immunostaining (**Fig. 4**) also showed a negative correlation between the predominant nuclear expression and the histological classification categorization score ($r = -0.49$; $p < 0.05$) (**Table 5**). Cytoplasmic expression for Cav3.3 was also observed in all histological classifications. The BWA presented cases with moderate (66.6%; 6/9) or weak intensity of staining (33.3%; 3/9). DH also shown a weak and moderate expression (46.6%; 7/15, for each), but one case was seen with strong intensity (6.6%; 1/15). DCIS present a greater number of cases with weak intensity (70.0%; 7/10) and a smaller number (30.0%; 3/10) with moderate. IDC showed a similar number of cases between weak (52.3%; 11/21) and moderate (42.8%; 9/21), and only one case with an absence of expression (4.7%; 1/21) (**Table 6**). The Cav3.3 expression was the only one, within Cav proteins, that a plasma membrane expression can be observed. This expression was found in three cases of the BWA, where one of them (11.1%; 1/9) presented up to 25% of the cells with this immunostaining and the other two (22.2%; 2/9) with positivity in 25 to 50% of cells. In addition to these, it can also be seen in only one case of DH (6.6% (1/15) with 25 to 50% of positive cells. Correlation showed a negative correlation with the membrane expression and the histological classification categorization score ($r = -0.34$; $p < 0.05$) (**Table 5**).

Discussion

In the present study, we observed that the expression pattern and the subcellular localization of Cav3 isoforms change when comparing neoplastic, non-neoplastic ductal proliferative epithelial lesions to mammary epithelium without alterations. It was possible to notice that Cav3 channels had higher nuclear immunostaining in normal and hyperplastic mammary epithelium than in neoplastic epithelial lesions. Thus, Cav3.1 and Cav3.2 seemed to follow

a pattern regarding the cytoplasmic expression, as the mammary epithelium transform to later stages. The results suggest that alterations in subcellular localization of Cav3 can be associated with different roles in tumorigenesis.

Changes in expression of other Ca²⁺ channels have already been found in breast tumours [20]. Modifications in the subcellular localization seen in our work were also observed at TRPM8 (a non-selective cation channel permeable to Ca²⁺) described in human prostate cancer cells. Although these channels were expressed in the endoplasmic reticulum (ER) membrane and absent in cellular membrane, overexpressed TRPM8 HEK cells presented it in both plasma and ER membranes and these changes seems to contribute to tumorigenesis through changes in Ca²⁺ signalling [32–34]. In addition, it has been reported that increase in ORAI1 expression promotes intracellular Ca²⁺ oscillations leading to the activation of proliferative signalling pathways in oesophageal squamous carcinoma cells [35].

Ca²⁺ influx through the membrane from the extracellular to intracellular environment is the most well-known function of Cav3 [36]. Unexpectedly, we did not detect Cav3 in the plasma membrane. We, then, reasoned that Ca²⁺ influx may not be a necessary condition to neoplastic transformation to breast cancer. The concept that an ion channel would have non-canonical functions were appreciated only recently and provide evidences that these proteins can act in other cellular processes, as control of proliferation, thought their interaction with cyclins and other cell cycle proteins [37–40].

It is reasonable to think that cytoplasmic immunostaining observed for these channels may be related with cellular trafficking of these proteins between different subcellular compartments, like ER, causing them to stop being expressed in the cell membrane [41]. This traffic can be influenced by mutations in the channel protein structure or by interaction with other proteins, such as adaptor proteins from Stac family and Kelch-like 1, an actin-organizing protein [42–44]. The expression of ion channels in cellular organelles was already described. In inner mitochondria membrane the presence of potassium channel was associated to apoptosis inhibition [45], while in lysosomes, the influx of Ca²⁺ ions can modulate autophagy, an important process for tumour cells survival [46]. BCL-2 overexpression in MCF-7 cells appear to modulate IP3R-resident in the ER, leading to the leakage of luminal Ca²⁺ and a consequent reduction in its reserve, making insufficient to elicit apoptosis by the accumulation of mitochondrial Ca²⁺ [32,47]. As far as we are aware of there were no studies that reported the presence of Cav3 in subcellular compartments, but it would be a possible explanation to our findings.

In the nucleus, calcium channels can act indirectly, through calcium ions acting as a second messenger. When Ca²⁺ influx occurs, transcription factors NFAT and NFκB can be translocated to the nucleus and will act on the transcription of genes related to cell survival, proliferation and immune response [48]. Another action that Cav3 inhibition may result is cell cycle arrest in G1 or G2 [49]. They can also act directly, Ryanodine Receptors and Inositol Triphosphate Receptors, types of ligand-gated Ca²⁺ channel, can be found in the nucleus, but their function in nuclear Ca²⁺ signalling is not elucidated yet [48]. In addition, gene transcription regulation has been demonstrated to Cav1.2 channels. This effect is related to the proteolytic cleavage of the 74 kDa peptide from the C-terminal of the α1-subunit that translocates to the nucleus to act as a transcriptional regulator [50]. Despite this, it is not known yet about the role of Cav3 in the cell nucleus.

Our results suggest that Cav3 channels act, still in an unknown way, in the process of progression from non-neoplastic proliferative epithelial lesions of the breast to neoplastic lesions, which consist of lesions formed by

cells with loss of differentiation. Such involvement in cell differentiation has already been seen in mouse pre-adipocytes, where an augmented expression of Cav3.1 was observed when compared to differentiated adipocytes [51]. This relationship has also been seen in prostate tumours that progress to tumours with neuroendocrine differentiation, a more aggressive tumour, with higher proliferation rates and a worse prognosis. Studies demonstrated that there was an increase in Cav3.2 expression in cell lines with neuroendocrine differentiation from the prostate tumour, indicating that this channel participates in morphological and biochemical changes in prostate tumour cells [52,53].

In conclusion, our results suggest that as the mammary epithelium advances in the neoplastic transformation model for invasive ductal carcinoma a decrease in Cav3 channels nuclear expression is observed. In parallel, there is an increase in Cav3.1 and Cav3.2 channels cytoplasmic expression. These promising findings will encourage further studies to gain insights for elucidating the role of these channels in neoplastic transformation of breast tumour. Therefore, understanding the localization, expression, and dynamics of these channels, will contribute to both the early detection of non-neoplastic lesions as well as in the investigation of novel potential therapeutic targets in breast cancer.

Acknowledgments and Funding Information

The authors thank *Universidade Federal de Minas Gerais* and *Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte*. This research was funded by the by *Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais* and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*.

References

1. Wild C, Weiderpass E, Stewart B. World cancer report 2020 [Internet]. World Health Organization. 2020. 630 p. Available at: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
2. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol*. 2008;9(8):730–56.
3. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol Oncol*. 2010;4(3):192–208.
4. Bandyopadhyay S, Bluth MH, Ali-Fehmi R. Breast Carcinoma: Updates in Molecular Profiling 2018. *Clin Lab Med* [Internet]. 2018;38(2):401–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.02.006>
5. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during CRC development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525–32.
6. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchiό C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways. *Histopathology*. 2010;57(2):171–92.
7. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*. 2005;205(2):248–54.
8. Kader T, Hill P, Rakha EA, Campbell IG, Goringe KL. Atypical ductal hyperplasia: Update on diagnosis, management, and molecular landscape. *Breast Cancer Res*. 2018;20(1):1–11.
9. Carraro DM, Elias E V., Andrade VP. Ductal carcinoma in situ of the breast: Morphological and molecular features implicated in progression. *Biosci Rep*. 2014;34(1):19–28.
10. Dupont WD, Page DL. Risk Factors for Breast Cancer in Women with Proliferative Breast Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 17 de janeiro de 1985;312(3):146–51. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198501173120303>
11. Hartmann LC, Radisky DC, Frost MH, Santen RJ, Vierkant RA, Benetti LL, et al. Understanding the Premalignant Potential of Atypical Hyperplasia through Its Natural History: A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Prev Res* [Internet]. 1 de fevereiro de 2014;7(2):211–7. Available at: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0222>
12. Menes TS, Kerlikowske K, Lange J, Jaffer S, Rosenberg R, Miglioretti DL. Subsequent Breast Cancer Risk Following Diagnosis of Atypical Ductal Hyperplasia on Needle Biopsy. *JAMA Oncol* [Internet]. 1 de janeiro de 2017;3(1):36. Available at: <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2016.3022>
13. Orr B, Kelley JL. Benign Breast Diseases: Evaluation and Management. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59(4):710–26.
14. Coleman WB. Breast Ductal Carcinoma in Situ: Precursor to Invasive Breast Cancer. *Am J Pathol* [Internet]. 2019;189(5):942–5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.03.002>
15. Shea EKH, Koh VCY, Tan PH. Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. *Pathol Int*. 2020;70(5):242–52.
16. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor- α and Ki-67 expression. *Am J Pathol*. 2002;160(2):597–604.
17. Santisteban M, Reynolds C, Barr Fritcher EG, Frost MH, Vierkant RA, Anderson SS, et al. Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast cancer in atypical hyperplasia. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 23

- de junho de 2010;121(2):431–7. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-009-0534-7>
18. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):517–29.
 19. Humeau J, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Nuñez L, Villalobos C, Kroemer G, et al. Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium* [Internet]. 2018;70:3–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2017.07.006>
 20. Monteith GR, Prevarskaya N, Roberts-Thomson SJ. The calcium-cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2017;17(6):367–80. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.18>
 21. Déliot N, Constantin B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2015;1848(10):2512–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.009>
 22. Williams DE. Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Toxicol Sci*. 2018;164(1):3–4.
 23. Bhargava A, Saha S. T-Type voltage gated calcium channels: a target in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2019;173(1):11–21. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-018-4970-0>
 24. Wang CY, Lai MD, Phan NN, Sun Z, Lin YC. Meta-analysis of public microarray datasets reveals voltage-gated calcium gene signatures in clinical cancer patients. *PLoS One*. 2015;10(7):1–21.
 25. Phan NN, Wang CY, Chen CF, Sun Z, Lai MD, Lin YC. Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett*. 2017;14(2):2059–74.
 26. Bertolesi GE, Shi C, Elbaum L, Jollimore C, Rozenberg G, Barnes S, et al. The Ca²⁺ channel antagonists mibefradil and pimozone inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Mol Pharmacol*. 2002;62(2):210–9.
 27. Taylor JT, Huang L, Pottle JE, Liu K, Yang Y, Zeng X, et al. Selective blockade of T-type Ca²⁺ channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett*. 2008;267(1):116–24.
 28. Basson MD, Zeng B, Downey C, Sirivelu MP, Tepe JJ. Increased extracellular pressure stimulates tumor proliferation by a mechanosensitive calcium channel and PKC-β. *Mol Oncol*. 2015;9(2):513–26.
 29. Ohkubo T, Yamazaki J. T-type voltage-activated calcium channel Ca_v3.1, but not Ca_v3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2012;41(1):267–75.
 30. Castro M, Grau L, Puerta P, Gimenes L, Venditti J, Quadrelli L, et al. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2011;13(1):29–40. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L361070358%5Cnhttp://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/1525-1578/PIIS152515781000022X.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.008%5Cnhttp://sfx.library.uu>
 31. Gobbi H. Classificação dos tumores da mama: Atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *J Bras Patol e Med Lab*. 2012;48(6):463–74.
 32. Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: Targeting Ca²⁺ transport. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(7):519–30.
 33. Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, Flourakis M, Bavencoffe A, Gordienko D, et al. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem*. 2005;280(47):39423–35.
 34. Mahieu F, Owsianik G, Verbert L, Janssens A, De Smedt H, Nilius B, et al. TRPM8-independent menthol-induced Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum and Golgi. *J Biol Chem*. 2007;282(5):3325–36.
 35. Zhu H, Zhang H, Jin F, Fang M, Huang M, Yang CS, et al. Elevated Orai1 expression mediates tumor-

- promoting intracellular Ca²⁺ oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(11):3455–71.
36. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev*. 2003;83(1):117–61.
 37. Capiod T. Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie* [Internet]. 2011;93(12):2075–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.07.015>
 38. Capiod T. The Need for Calcium Channels in Cell Proliferation. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2012;8(1):4–17.
 39. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pillozzi S, Becchetti A. Targeting Ion Channels in Cancer: A Novel Frontier in Antineoplastic Therapy. *Curr Med Chem*. 2008;16(1):66–93.
 40. Capiod T. Extracellular calcium has multiple targets to control cell proliferation. *Adv Exp Med Biol*. 2016;898:133–56.
 41. Catterall WA. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 1 de agosto de 2011;3(8):a003947–a003947. Available at: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a003947>
 42. Weiss N, Zamponi GW. Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signal*. 2017;1(1):1–16.
 43. Rzhpetskiy Y, Lazniewska J, Proft J, Campiglio M, Flucher BE, Weiss N. A Cav3.2/Stac1 molecular complex controls T-type channel expression at the plasma membrane. *Channels*. 2016;10(5):346–54.
 44. Simms BA, Zamponi GW. Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(6):843–56.
 45. Leanza L, Biasutto L, Managò A, Gulbins E, Zoratti M, Szabò I. Intracellular ion channels and cancer. *Front Physiol*. 2013;4 SEP(September):1–7.
 46. Kondratskiy A, Yassine M, Kondratska K, Skryma R, Slomianny C, Prevarskaya N. Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Front Physiol*. 2013;4 OCT(October):1–12.
 47. Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(50):17404–9.
 48. Alonso MT, García-Sancho J. Nuclear Ca²⁺ signalling. *Cell Calcium* [Internet]. 2011;49(5):280–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.004>
 49. Antal L, Martin-Caraballo M. T-type calcium channels in cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2):1–18.
 50. Chung HJ, Jan LY. Channeling to the Nucleus. *Neuron* [Internet]. dezembro de 2006;52(6):937–40. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627306009378>
 51. Oguri A, Tanaka T, Iida H, Meguro K, Takano H, Oonuma H, et al. Involvement of Cav3.1 T-type calcium channels in cell proliferation in mouse preadipocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2010;298(6):1414–23.
 52. Hall M, Todd B, Allen ED, Nguyen N, Kwon Y-J, Nguyen V, et al. Androgen receptor signaling regulates T-type Ca²⁺ channel expression and neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *Am J Cancer Res*. 2018;8(4):732–47.
 53. Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, et al. CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2008;283(15):10162–73.

Tables and figures

	Cytoplasmic immunostaining	Nuclear immunostaining positive/negative	Predominant nuclear immunostaining	Histological classification
Cytoplasmic immunostaining	1.00	--	--	--
Nuclear immunostaining positive/negative	-0.28	1.00	--	--
Predominant nuclear immunostaining	-0.42 *	--	1.00	--
Histological classification	0.49 *	-0.53 *	-0.73 *	1.00

Table 1 Pearson correlation coefficient matrix of Cav3.1 immunohistochemical staining. * indicate p <0.05.

	Absent	Weak	Moderate	Strong
Mammary gland without alteration	87.5% (7/8)	12.5% (1/8)	--	--
Ductal hyperplasia	80.0% (8/10)	--	20.0% (2/10)	--
Ductal carcinoma <i>in situ</i>	30.0% (3/10)	60.0% (6/10)	10.0% (1/10)	--
Invasive ductal carcinoma	26.3% (5/19)	31.5% (6/19)	42.1% (8/19)	--

Table 2 Percentage of cases with cytoplasmic immunostaining categorized in absent expression, and weak, moderate, or strong intensity of labelling for Cav3.1.

	Cytoplasmic immunostaining	Nuclear immunostaining positive/negative	Predominant nuclear immunostaining	Histological classification
Cytoplasmic immunostaining	1.00	--	--	--
Nuclear immunostaining positive/negative	-0.17	1.00	--	--
Predominant nuclear immunostaining	-0.12	--	1.00	--
Histological classification	0.28 *	-0.29 *	-0.41 *	1.00

Table 3 Pearson correlation coefficient matrix for Ca_v3.2 immunohistochemical staining. * indicate p <0.05.

	Absent	Weak	Moderate	Strong
Mammary gland without alteration	--	100.0% (9/9)	--	--
Ductal hyperplasia	12.5% (2/16)	75.0% (12/16)	12.5% (2/16)	--
Ductal carcinoma <i>in situ</i>	--	76.9% (10/13)	23.0% (3/13)	--
Invasive ductal carcinoma	4.5% (1/22)	59.0% (13/22)	36.3% (8/22)	--

Table 4 Percentage of cases with cytoplasmic immunostaining categorized in absent expression, and weak, moderate, or strong intensity of labelling for Ca_v3.2.

	Cytoplasmic immunostaining	Nuclear immunostaining positive/negative	Predominant nuclear immunostaining	Histological classification	Membranar immunostaining
Cytoplasmic immunostaining	1.00	--	--	--	--
Nuclear immunostaining positive/negative	0.23	1.00	--	--	--
Predominant nuclear immunostaining	0.23	--	1.00	--	--
Histological classification	-0.20	-0.30 *	-0.49 *	1.00	--
Membranar immunostaining	0.24	0.12	0.25	-0.34 *	1.00

Table 5 Pearson correlation coefficient matrix for Cav3.3 immunohistochemical staining. * indicate p <0.05.

	Absent	Weak	Moderate	Strong
Mammary gland without alteration	--	33.3% (3/9)	66.6% (6/9)	--
Ductal hyperplasia	--	46.6% (7/15)	46.6% (7/15)	6.6% (1/15)
Ductal carcinoma <i>in situ</i>	--	70.0% (7/10)	30.0% (3/10)	--
Invasive ductal carcinoma	4.7% (1/21)	50.3% (11/21)	42.8% (9/21)	--

Table 6 Percentage of cases with cytoplasmic immunostaining categorized in absent expression, and weak, moderate, or strong intensity of labelling for Cav3.3.

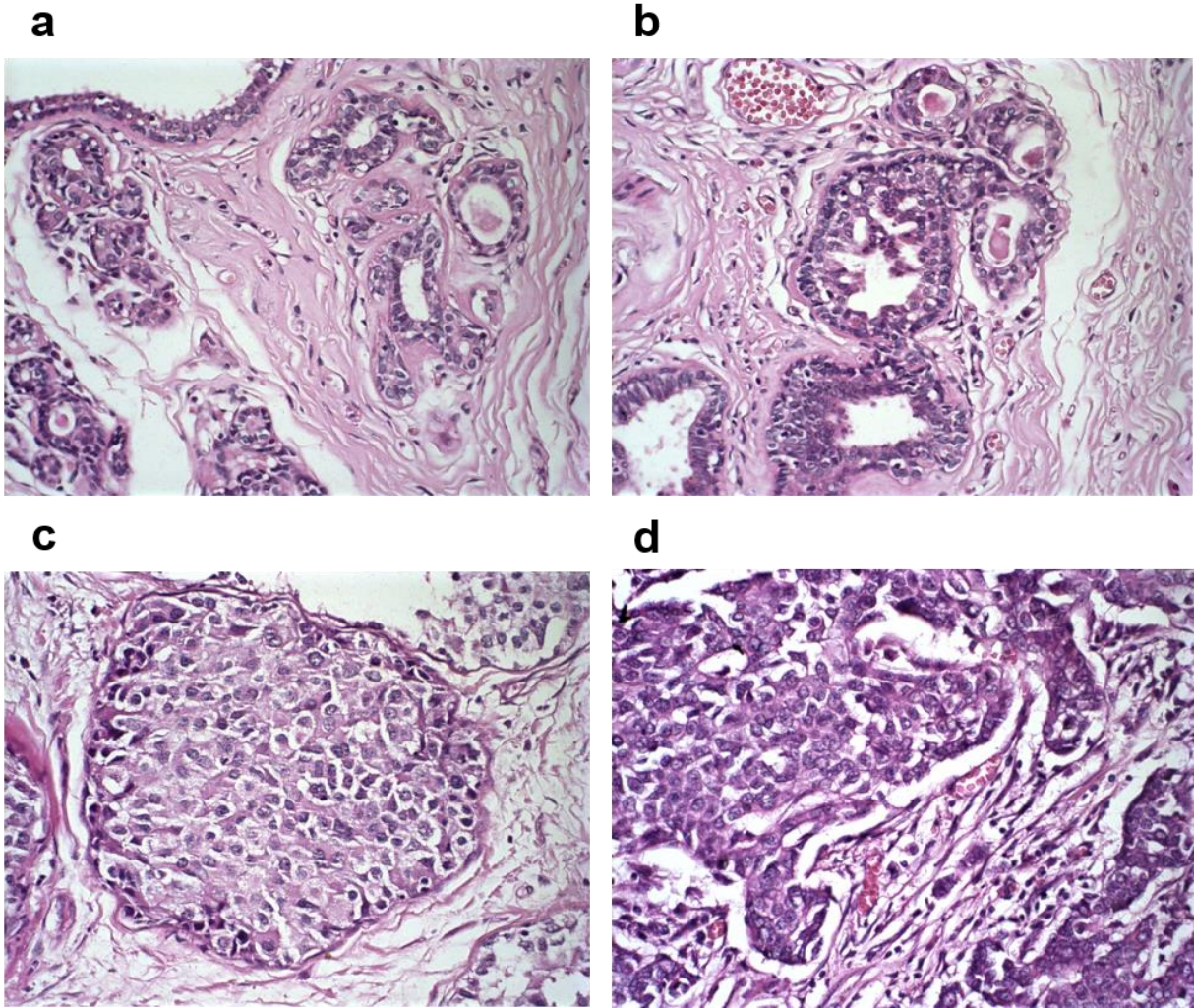


Fig. 1 Classification of histological types. Mammary glands, stained with hematoxylin and eosin, 400x. (a) Breast without alteration; (b) Ductal hyperplasia; (c) Ductal carcinoma *in situ*; (d) Invasive ductal carcinoma.

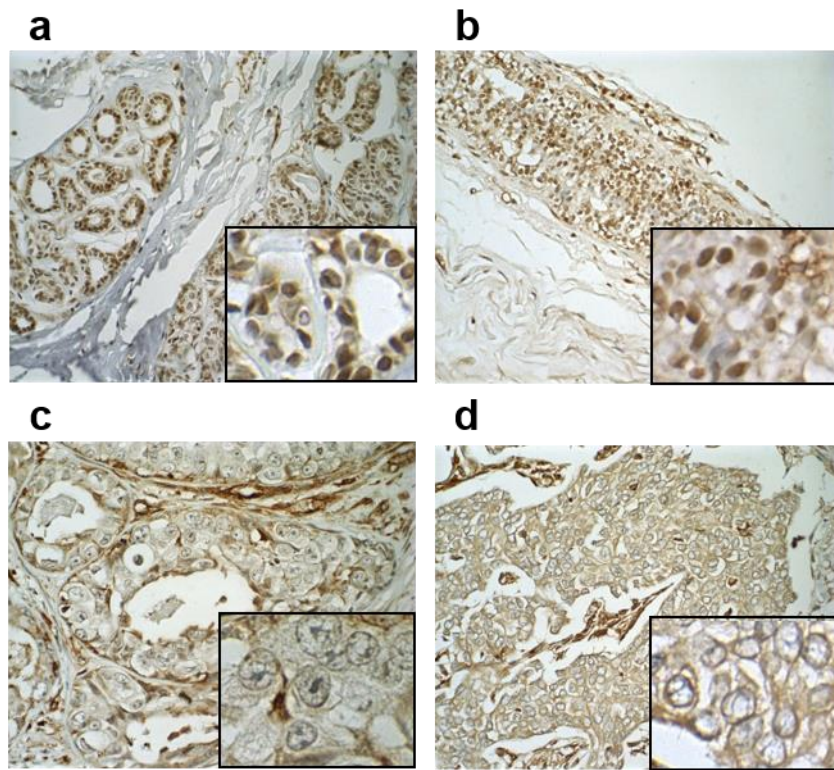


Fig. 2 Human mammary glands with immunohistochemical staining for Cav_v3.1. Identified by DAB chromogen and counterstained with hematoxylin. 400x magnification and 600x insert. **(a)** Breast without alteration showing nuclear expression (arrow) and the absence of cytoplasmic immunostaining. **(b)** Ductal hyperplasia with the presence of nuclear immunostaining (arrow). **(c)** Ductal carcinoma *in situ* showing decreased nuclear expression and presence of cytoplasmic expression (arrow). **(d)** Invasive ductal carcinoma with few nuclear immunostainings and with the presence of cytoplasmic expression (arrow).

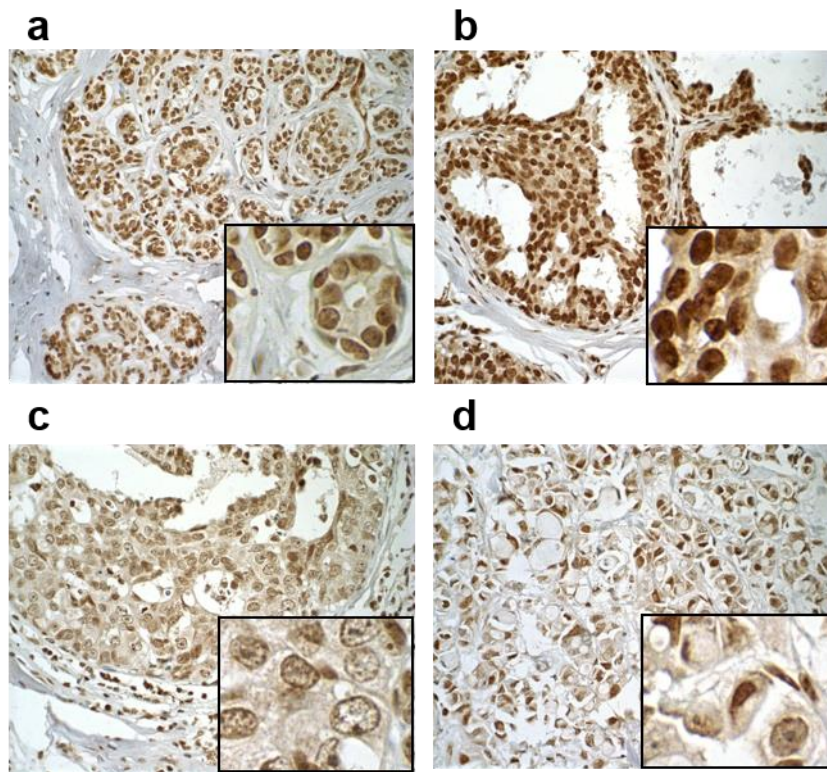


Fig. 3 Human mammary glands with immunohistochemical staining for Cav3.2. Identified by DAB chromogen and counterstained with hematoxylin. 400x magnification and 600x insert. **(a)** Breast without alteration showing nuclear expression (arrow) and the absence of cytoplasmic immunostaining. **(b)** Ductal hyperplasia with the presence of nuclear expression (arrow). **(c)** Ductal carcinoma *in situ* showings decreased of nuclear expression and presence of cytoplasmic immunostaining (arrow). **(d)** Invasive ductal carcinoma with few nuclear immunostainings and with the presence of cytoplasmic expression (arrow).

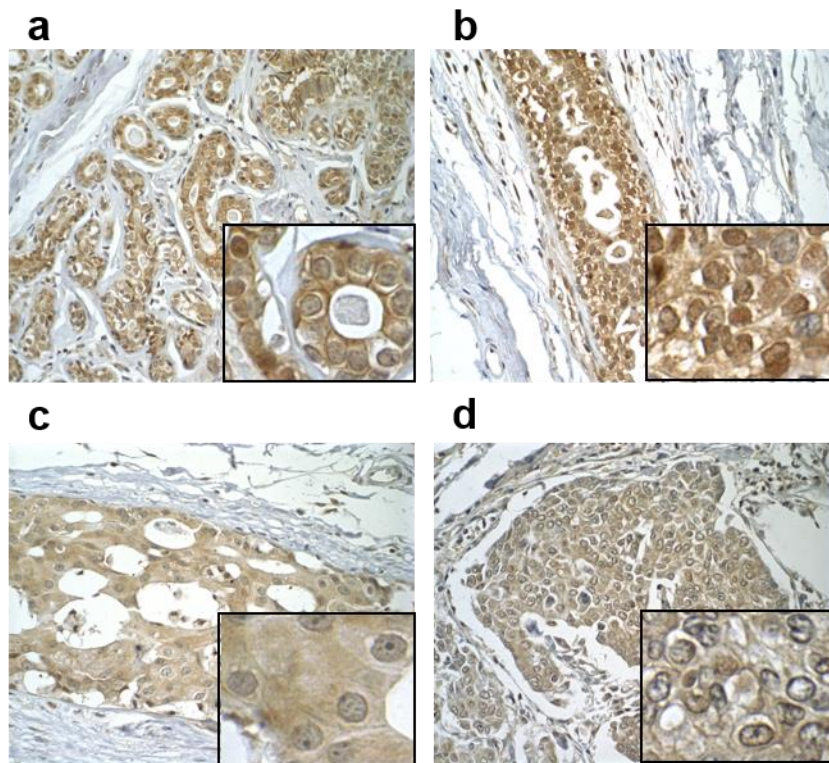


Fig. 4 Human mammary glands with immunohistochemical staining for Cav3.3. Identified by DAB chromogen and counterstained with hematoxylin. 400x magnification and 600x insert. **(a)** Breast without alteration showing nuclear expression (arrow) and the absence of cytoplasmic immunostaining. **(b)** Ductal hyperplasia with the presence of nuclear expression (arrow). **(c)** Ductal carcinoma *in situ* showings decreased of nuclear expression and presence of cytoplasmic expression (arrow). **(d)** Invasive ductal carcinoma with few nuclear immunostainings and with the presence of cytoplasmic expression (arrow).

5.2 Short Communication

Identification of L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels involved in pre-neoplastic transformation of breast cancer

Flávia Aguiar¹; Paula Rhana²; Enrrico Bloise³; Jader S. Cruz²; Andreia Laura Rodrigues⁴; Enio Ferreira¹.

¹ Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

² Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

³ Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author: Enio Ferreira. Email: enioferreira@ufmg.br

Abstract

The intracellular Ca²⁺ levels can modulate several cellular functions, including proliferation and other processes found altered in neoplastic cells. One of the responsible for maintaining their homeostasis is the L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels, but changes in its expression in neoplasia, including breast cancer has been identified. Invasive ductal carcinoma, the most common classification of breast cancer, has ductal hyperplasia and ductal carcinoma *in situ* as its possible non-obligate precursors. The participation of this channel in breast cancer development from these precursors has not been investigate. Evaluate the protein expression and the subcellular localization of Cav1.1, Cav1.2 and Cav1.3 in the mammary epithelium without alteration and in neoplastic and non-neoplastic ductal proliferative lesions through immunohistochemistry was the main objective of this investigation. It was observed in Cav1.3 a reduction in nuclear expression in neoplastic lesions, in addition to an increase in cytoplasmic Cav1.1. The analyses of membrane immunostaining showed that Cav1.2 and Cav1.3 had an increase in this expression as the lesions progressed in the stages leading to invasive ductal carcinoma. Changes in protein expression and subcellular localization of these channels during the progression stages indicate that they may be involved in neoplastic transformation.

Keywords: Breast cancer; Ductal hyperplasia; Carcinoma *in situ*; L-type voltage-dependent calcium channel; LTCC; Neoplastic transformation.

Declarations

Fundings

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG #10274/16 e #00056/15 grants to Jader S. Cruz). Flávia Aguiar and Paula Rhana hold a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Conflicts of interest/competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and material

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Code availability

(software application or custom code)

Authors contributions

Conception and study design: F.A., A.L.R. and E.F.; case selection: F.A., E.B; E.F.; sample processing and experiments: F.A.; data analysis and interpretation: F.A.; P.R.; A.L.R.; J.S.C.; E.F.; wrote the manuscript: F.A.; E.F.. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

This work was carried following the ethical principles for the use of human material as a primary source of information after approval by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa – COEP) of the Federal University of Minas Gerais and of the Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (33481919.4.0000.5149 and 33481919.4.3001.5138, respectively).

Acknowledgments and Funding Information

The authors thank *Universidade Federal de Minas Gerais* and *Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte*. This research was funded by the by *Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais* and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*.

Introduction

Calcium ions can also assist in the regulation of fertilization, secretion, contraction, transcription and phosphorylation, through intracellular signalling, since they are second messengers (Berridge et al. 2000). The homeostasis of this ion must be maintained properly to avoid the development of a cell with malignant characteristics (Déliot e Constantin 2015). Seen this, Ca^{2+} can be released from intracellular organelles or from the extracellular through channels, such as voltage-dependent Ca^{2+} channels (Berridge et al. 2003).

L-type calcium channels (LTCC), a voltage-dependent Ca^{2+} channel family, have long-lasting Ca^{2+} currents and require strong membrane depolarization for activation (Catterall et al. 2005). Its structure consists of an $\alpha 1$ subunit, responsible for the formation of the pore and the main biophysical and functional properties of the channel. This subunit can be encoded by four different genes, CACNA1S, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1F that originates the four isoforms of these channels, $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ e $\text{Ca}_v1.4$, respectively (Zamponi et al. 2015). In addition to $\alpha 1$, LTCC also has the auxiliary subunits β , $\alpha 2\delta$, and γ that control the expression of the channel, its membrane incorporation, its binding to blocking drugs and $\alpha 1$ opening characteristics (Triggle 2006).

LTCCs are found in smooth and skeletal muscle, ventricular myocytes, and osteoblasts, but their presence has also been seen in non-excitabile tissues and tumours, highlighting the possibility of a relationship of these channels with the cell's malignant process. The $\text{Ca}_v1.1$ gene expression has already been observed increased, concerning normal tissue samples, in acute myeloid leukaemia, in brain desmoplastic medulloblastoma and primitive neuroectodermal tumours. $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ were also seen overexpressed in several tumours, including breast carcinomas. Only $\text{Ca}_v1.4$, which are physiologically found in the retina, have not yet been identified in carcinomas (Wang et al. 2015). Some studies demonstrate the participation of LTCC-mediated Ca^{2+} influx by increasing migration in breast cancer cell lines, MDA-MB-468 (Garib et al. 2005), as well as regulating the filopodia and tumour invasion in MDA-MB-231, PDAC and U2OS (Jacquemet et al. 2016). In addition to the evidence pointing to their participation in migration, it has already been shown that the expression of $\text{Ca}_v1.2$ in MCF-7 cells, can be regulated by dihydrotestosterone, resulting in decreased proliferation (Marques et al. 2015) and also that LTCC can mediate proliferation in HepG2.2.15 (Phiwchai et al. 2020). Also, some studies report its role in apoptosis and even modulating drug resistance in colon tumours and diffuse large B cell lymphomas, respectively (Zawadzki et al. 2008; Zhang et al. 2019).

LTCC may be related mainly to the migration and proliferation of some tumours, including the tumour with the highest incidence and mortality among women, breast carcinoma (Wild et al. 2020). Invasive ductal carcinoma (IDC) the most common histological classification of breast cancer (Bandyopadhyay et al. 2018), has a neoplastic transformation model starting with ductal hyperplasias (DH), after they can transform to ductal carcinoma *in situ* (DCIS) and finally, they can transform in IDC. These injuries are considered possible non-obligate precursors of IDC (Simpson et al. 2005; Lopez-Garcia et al. 2010) and women with one of these diagnoses is two to ten times more likely to develop the invasive lesion (Dupont e Page 1985; Carraro et al. 2014; Hartmann et al. 2014; Menes et al. 2017).

It is well established that the increased risk of transformation of pre-neoplastic lesions is related to high proliferative rates (Shaaban et al. 2002; Santisteban et al. 2010), and, although there are suggestions of LTCC involvement in breast tumour cells by modulating proliferation and migration, no studies are evaluating whether

these channels could participate in the tumour transformation process for invasive ductal carcinomas. This work aims to analyse the protein expression and subcellular localization of Cav1.1, Cav1.2 and Cav1.3 in the breast without alteration and in proliferative, non-neoplastic and neoplastic ductal epithelial lesions, of the human breast. These analyses support the hypothesis of the participation of LTCC in the neoplastic transformation of breast cancer from pre-neoplastic lesions, mainly related to the change of their localizations in the mammary epithelium.

Materials and Methods

Specimens selection and Histopathological Evaluation

Human mammary gland tissues, stored in paraffin blocks, from 30 patients from *Hospital Santa Casa de Misericórdia in Belo Horizonte*, between the years 2010 and 2015, were reviewed for their histological classification and quality of the material for the realization of the immunohistochemistry technique. The study was approved by the local hospital Ethics Committee, with adherence to the Declaration of Helsinki. The approval ID of the Ethics Committee is 33481919.4.0000.5149 and 33481919.4.3001.5138.

Histological analyzes, carried out using Hematoxylin-Eosin staining and optical microscopy, were performed to classify, according to the guidelines of the World Health Organization (Gobbi 2012), the different regions of each sample in Breast without alteration (BWA); Ductal hyperplasia (DH); Ductal carcinoma *in situ* (DCIS); Invasive ductal carcinoma (IDC). To allow future statistical analysis, the classified regions received scores 1, 2, 3 and 4, respectively. Reinforcing the idea that each of the samples analyzed can have different regions with various histological alterations, in addition to the normal mammary epithelium, the regions were classified and analyzed individually.

Immunohistochemistry

To perform immunohistochemistry technique, histological sections of 4 µm of the samples were obtained, mounted on gelatinized slides, deparaffinized and rehydrated using graded concentrations of ethanol. The immunohistochemistry staining was carried out using the peroxidase reaction with identification from the polymerized secondary antibody (Novocastra Post Primary and Novolink Polymer; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). The antigen retrieval occurred in pressurized humid heat at 137°C (Autoclave ALT 5LD plus; ALT, São Paulo, Brazil) with Target Retrieval Solution Citrate - low pH (Agilent Technologies, California, US). To block endogenous peroxidase and protein the slides were incubated in Novocastra Peroxidase Block and Novocastra Protein Block (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). Antibodies against Cav1.1, Cav1.2 and Cav1.3 (G-1; D-6; E-3, Santa Cruz Biotechnology) were used at concentrations of 1:50, 1:50 and 1: 150, respectively. The incubation time for the primary antibodies was 16 hours and for the 3'3-diaminobenzidine chromogen (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK), 1 minute. After the DAB incubation, the sections were counterstained with Hematoxylin. Samples of human skeletal muscle for Cav1.1, human smooth muscle for Cav1.2 and Cav1.3 were used for positive control. For negative control, the primary antibody incubation stage was replaced by incubation with mouse immunoglobulins, which is the species that the primary antibodies were produced.

Interpretation of Immunohistochemical Findings

All histological analyzes were performed using conventional optical microscopy in a 40x objective (Olympus - BX41) and the images were captured from a system using a SPOT 3.4.5 Basic® camera adapted to an Olympus Microscope (BX41). Some samples that did not show immunohistochemical reactivity for certain antibodies were discarded.

Each antibody used had its cytoplasmic, nuclear and membrane immunostaining analyzed in all studied regions. Cytoplasmic expression was assessed according to its intensity of expression and followed the score: 0: the absence of expression; 1+: weak; 2+: moderate; 3+: strong. For the nuclear expression analysis, the percentage of cells with no expression, weak, moderate, or strong intensity was first estimated in a semi-quantitative way. Then, these data, in each of the regions, were segregated into negative expression, considering the sum of the percentages of cells with no expression and weak intensity; and positive expression, this being the sum of the percentages of cells with moderate or strong intensity. The percentages of nuclear expression were also classified according to the intensity of predominant expression, where: 0: the absence of expression; 1+: weak intensity; 2+: moderate; 3+: strong. Membrane expression, on the other hand, was classified by the percentage of cells that had this immunostaining and followed score 0 (absence of expression); 1+ (<25%); 2+ (25% - 50%); 3+ (> 50%).

Statistical analysis

Possible correlations were assessed using the Pearson test. Results were considered significant when the probability of test significance was $p < 0.05$. Statistical analyzes were performed with the aid of the GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Results and discussion

Histopathological analyzes were performed in 30 cases and different regions of the same sample were analyzed and classified individually. From this analyses, 44 distinct histological aspects were identified and in 11 cases there was more than one region to be analyzed. 13 histological areas with BWA, 15 with DH, 9 with DCIS and 7 with IDC were analyzed. Immunohistochemistry for the three markers was performed in all cases and the immunoreaction was analyzed for nuclear, cytoplasmic and membrane immunostaining (**Fig. 1**)

When analyzing the immunostaining for $Ca_v1.3$ a negative correlation was observed between its nuclear expression and the histological classification of the lesions ($r = -0.43$; $p < 0.05$; **Table 1**), indicating that there is a reduction in this expression as the cells advance in the stepped transformation model for the IDC. Differently, $Ca_v1.2$ showed weak or absent nuclear expression in all analyzed cases, which were categorized as negative nuclear expression. So far, the presence of LTCC in the cell nucleus has not been studied, but the presence of a variety of ion channels in the nuclear membrane, such as Ryanodine and Inositol triphosphate receptors, is already known. In addition to them, the presence of another family of voltage-dependent Ca^{2+} channels has been seen, the R-type channels. They have already been observed in the nucleus of human aorta epithelial cells, and other diverse cell types. Once in the nucleus, these channels are responsible for sustained Ca^{2+} current in the nuclear membrane, participating in nuclear Ca^{2+} homeostasis, being important in gene expression, proteins synthesis, as well as in the traffic of macromolecules through the nuclear pore complexes (Bkaily et al. 2009). The decrease in LTCC expression in the nucleus of neoplastic cells may be related to the deregulation of some processes that contribute to tumour transformation.

In the analysis of cytoplasmic immunoreactive, it was possible to observe expression for all channels under study and surprisingly, the cytoplasmic immunostaining of Cav1.1 showed a positive correlation with the predominant nuclear expression score ($r = 0.62$; $p < 0.05$; **Table 2**). This result shows that this isoform follows the same pattern of immunoexpression in different cell compartments, whether in high or low expression. Regarding the cytoplasmic expression of Cav1.2, 100.0% of the cases of all classifications presented cytoplasmic marking, as well as 100.0% of the cases of IDC with immunoexpression for Cav1.3, not being possible to observe correlations with the nuclear expression pattern (**Table 3**). The presence of abundant cytoplasmic immunostaining in all histological classifications analyzed suggests that these channels play essential functions in intracellular organelles. The traffic between the endoplasmic reticulum (where they are produced), the cell membrane and the organelles aim to regulate the function and expression of the channel and this movement can be controlled by β and $\alpha 2\delta$ subunits (Weiss e Zamponi 2017; Dolphin 2018). In cytoplasmic organelles, lysosomes are one of the possible localizations of LTCC, since the presence of voltage-gated Ca^{2+} channels has already been seen in these structures (Zhong et al. 2017). Once in lysosomes, the influx of calcium ions can modulate autophagy, an important process for the cell survival of tumour cells (Kondratskyi et al. 2013). In addition to lysosomes, another possible localization would be the mitochondria and endoplasmic reticulum, where the presence of other ion channels that are related to the inhibition of apoptosis in tumour cells has been reported (Brini 2000; Leanza et al. 2013).

Membrane immunoexpression was observed only for Channels Cav1.2 and 1.3, with a gradual increase in immunoexpression being revealed in hyperplastic and neoplastic lesions. (**Table 4**). This profile of membrane immunostaining was corroborated by the analysis of the positive correlation between histological classification and membrane expression score for Cav1.2 ($r = 0.69$; $p < 0.05$) and Cav1.3 ($r = 0.54$; $p < 0.05$; **Table 1**), showing that there is an increase in this expression as the cells advance in the model of progression in stages for the IDC. Once found in the cell membrane, it can be inferred that these channels are performing the function of the influx of Ca^{2+} into the cell. This LTCC-mediated Ca^{2+} entry can trigger the activation of different transcription factors, such as CREB, NFAT and DREAM that will act on gene regulation (Barbado et al. 2009) and may be responsible for tumour progression of cells seen in this study. Highlighting that CREB is usually overexpressed in breast carcinomas and is associated with resistance to antiproliferative signals, apoptosis, angiogenesis, invasions, and metastases (Steven et al. 2020). Also, it has been seen that increasing the intracellular concentration of Ca^{2+} through Cav1.2 leads to cleavage and translocalization to the nucleus of a fragment of C-terminus of the pore-forming unit, called CCAT, binding to transcriptional regulators gene, thus modulating the expression of several genes (Barbado et al. 2009). Besides, the absence of immunostaining for Cav1.1 indicates that this channel may be involved in functions other than Ca^{2+} influx at the plasma membrane (Arcangeli et al. 2008; Capiod 2011).

In summary, our results showed a higher nuclear expression of Cav1.3 in lesions at the beginning of the neoplastic transformation model, which may suggest that the role played by this channel in the nucleus of breast epithelial cells may be related, in a still unknown mechanism, with the neoplastic transformation process. Also, it was seen that Cav1.2 and Cav1.3 showed an increase in membrane expression as the regions advanced in the histological classifications, indicating a possible role of these isoforms in the process of transformation of non-neoplastic proliferative epithelial lesions of the breast for neoplastic lesions. In conclusion, although there is still no evidence in the mechanisms, these results suggest a role for Cav1.1, Cav1.2 and Cav1.3 in the breast tumour transformation process. Therefore, a better understanding of the role that each of the isoforms is playing in different subcellular

localization and the traffic dynamics of these channels can allow a better understanding of neoplastic transformation, can even be avoided via existing LCTT blocking drugs, or even in the identification of neoplastic lesions more prone to evolution.

References

- Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, et al (2008) Targeting Ion Channels in Cancer: A Novel Frontier in Antineoplastic Therapy. *Curr Med Chem* 16:66–93. <https://doi.org/10.2174/092986709787002835>
- Bandyopadhyay S, Bluth MH, Ali-Fehmi R (2018) Breast Carcinoma: Updates in Molecular Profiling 2018. *Clin Lab Med* 38:401–420. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.02.006>
- Barbado M, Fablet K, Ronjat M, De Waard M (2009) Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1793:1096–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.02.004>
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bkaily G, Avedanian L, Jacques D (2009) Nuclear membrane receptors and channels as targets for drug development in cardiovascular diseases. *Can J Physiol Pharmacol* 87:108–119. <https://doi.org/10.1139/Y08-115>
- Brini M (2000) Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca²⁺ signalling. *EMBO J* 19:4926–4935. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4926>
- Capiod T (2011) Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie* 93:2075–2079. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.07.015>
- Carraro DM, Elias E V., Andrade VP (2014) Ductal carcinoma in situ of the breast: Morphological and molecular features implicated in progression. *Biosci Rep* 34:19–28. <https://doi.org/10.1042/BSR20130077>
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure–function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 57:427–450. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.6>
- Déliot N, Constantin B (2015) Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1848:2512–2522. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.009>
- Dolphin AC (2018) Voltage-gated calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits: an assessment of proposed novel roles. *F1000Research* 7:1–14
- Dupont WD, Page DL (1985) Risk Factors for Breast Cancer in Women with Proliferative Breast Disease. *N Engl J Med* 312:146–151. <https://doi.org/10.1056/NEJM198501173120303>
- Garib V, Lang K, Niggemann B, et al (2005) Propofol-induced calcium signalling and actin reorganization within breast carcinoma cells. *Eur J Anaesthesiol* 22:609–615
- Gobbi H (2012) Classificação dos tumores da mama: Atualização baseada na nova classificação da Organização

- Mundial da Saúde de 2012. *J Bras Patol e Med Lab* 48:463–474. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000600013>
- Hartmann LC, Radisky DC, Frost MH, et al (2014) Understanding the Premalignant Potential of Atypical Hyperplasia through Its Natural History: A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Prev Res* 7:211–217. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0222>
- Jacquemet G, Baghirov H, Georgiadou M, et al (2016) L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. *Nat Commun*. <https://doi.org/DOI:10.1038/ncomms13297>
- Kondratskyi A, Yassine M, Kondratska K, et al (2013) Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Front Physiol* 4 OCT:1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00272>
- Leanza L, Biasutto L, Managò A, et al (2013) Intracellular ion channels and cancer. *Front Physiol* 4 SEP:1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00227>
- Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, et al (2010) Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57:171–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03568.x>
- Marques R, Peres C, Vaz C, et al (2015) 5 α -Dihydrotestosterone regulates the expression of L-type calcium channels and calcium-binding protein regucalcin in human breast cancer cells with suppression of cell growth. *Med Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0676-x>
- Menes TS, Kerlikowske K, Lange J, et al (2017) Subsequent Breast Cancer Risk Following Diagnosis of Atypical Ductal Hyperplasia on Needle Biopsy. *JAMA Oncol* 3:36. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3022>
- Phiwchai I, Thongtem T, Thongtem S, Pilapong C (2020) Liver Cancer Cells Uptake Labile Iron via L-type Calcium Channel to Facilitate the Cancer Cell Proliferation. *Cell Biochem Biophys*. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00951-0>
- Santisteban M, Reynolds C, Barr Fritcher EG, et al (2010) Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast cancer in atypical hyperplasia. *Breast Cancer Res Treat* 121:431–437. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0534-7>
- Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS (2002) Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor- α and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 160:597–604. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64879-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64879-1)
- Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR (2005) Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 205:248–254. <https://doi.org/10.1002/path.1691>
- Steven A, Friedrich M, Jank P, et al (2020) What turns CREB on? And off? And why does it matter? *Cell Mol Life Sci* 77:4049–4067. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03525-8>

- Triggle DJ (2006) L-Type Calcium Channels. *Curr Pharm Des* 12:443–457.
<https://doi.org/10.2174/138161206775474503>
- Wang CY, Lai MD, Phan NN, et al (2015) Meta-analysis of public microarray datasets reveals voltage-gated calcium gene signatures in clinical cancer patients. *PLoS One* 10:1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125766>
- Weiss N, Zamponi GW (2017) Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signal* 1:1–16.
<https://doi.org/10.1042/ns20160003>
- Wild C, WEIDERPASS E, STEWART B (2020) World cancer report 2020
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC (2015) The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 67:821–870.
<https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
- Zawadzki OA, Liu MDQ, Wang PDY, et al (2008) Verapamil Inhibits L-type Calcium Channel Mediated Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. *1702:1696–1702*. <https://doi.org/10.1007/s10350-008-9372-7>
- Zhang J, Zhang P, Zhou W, et al (2019) L-Type Cav 1 . 2 Calcium Channel- a -1C Regulates Response to Rituximab in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *25:4168–4179*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2146>
- Zhong XZ, Yang Y, Sun X, Dong XP (2017) Methods for monitoring Ca²⁺ and ion channels in the lysosome. *Cell Calcium* 64:20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.12.001>

Tables and figures

	Cytoplasmic immunostaining	Nuclear immunostaining positive/negative	Predominant nuclear immunostaining	Histological classification	Membranar immunostaining
Cytoplasmic immunostaining	1.00	--	--	--	--
Nuclear immunostaining positive/negative	0.15	1.00	--	--	--
Predominant nuclear immunostaining	0.16	0.68	1.00	--	--
Histological classification	0.07	-0.15	-0.43 *	1.00	--
Membranar immunostaining	0.00	0.00	-0.13	0.54 *	1.00

Table 1 Pearson correlation coefficient matrix for Cav1.3 immunohistochemical staining. * indicate p <0.05.

	Cytoplasmic immunostaining	Nuclear immunostaining positive/negative	Predominant nuclear immunostaining	Histological classification
Cytoplasmic immunostaining	1.00	--	--	--
Nuclear immunostaining positive/negative	0.40 *	1.00	--	--
Predominant nuclear immunostaining	0.62 *	--	1.00	--
Histological classification	-0,08	-0.15	-0.31	1.00

Table 2 Pearson correlation coefficient matrix of Cav1.1 immunohistochemical staining. * indicate p <0.05.

		No expression	Weak	Moderate	Strong
		Cytoplasmic Expression			
Ca_v1.1	Breast without alteration	18.1% (2/11)	45.4% (5/11)	36.3% (4/11)	0.0% (0/11)
	Ductal hyperplasia	10.0% (1/10)	50.0% (5/10)	40.0% (4/10)	0.0% (0/10)
	Ductal carcinoma <i>in situ</i>	33.3% (1/3)	66.6% (2/3)	0.0% (0/3)	0.0% (0/3)
	Invasive ductal carcinoma	16.6% (1/6)	66.6% (4/6)	16.6% (1/6)	0.0% (0/6)
Ca_v1.2	Breast without alteration	0.0% (0/10)	60% (6/10)	40% (4/10)	0.0% (0/10)
	Ductal hyperplasia	0.0% (0/11)	63.6% (7/11)	27.2% (3/11)	9.0% (1/11)
	Ductal carcinoma <i>in situ</i>	0.0% (0/5)	80.0% (4/5)	20.0% (1/5)	0.0% (0/5)
	Invasive ductal carcinoma	0.0% (0/3)	33.3% (1/3)	66.6% (2/3)	0.0% (0/3)
Ca_v1.3	Breast without alteration	9.0% (1/11)	36.3% (4/11)	45.4% (5/11)	9.0% (1/11)
	Ductal hyperplasia	8.3% (1/12)	66.6% (8/12)	25% (3/12)	0.0% (0/12)
	Ductal carcinoma <i>in situ</i>	33.3% (2/6)	50.0% (3/6)	16.3% (1/6)	0.0% (0/6)
	Invasive ductal carcinoma	0.0% (0/6)	50.0% (3/6)	50.0% (3/6)	0.0% (0/6)

Table 3 Percentage of cases with cytoplasmic immunostaining categorized in no expression, and weak, moderate, or strong intensity of Ca_v1.1, Ca_v1.2 and Ca_v1.3 immunostaining.

MEMBRANAR EXPRESSION

		No expression	(<25%)	(25% - 50%)	(>50%)
Cav1.2	Breast without alteration	100.0% (10/10)	0.0% (0/10)	0.0% (0/10)	0.0% (0/10)
	Ductal hyperplasia	45.4% (5/11)	36.3% (4/11)	0.0% (0/11)	18.1% (2/11)
	Ductal carcinoma <i>in situ</i>	0.0% (0/5)	40.0% (2/5)	40.0% (2/5)	20.0% (1/5)
	Invasive ductal carcinoma	0.0% (0/3)	0.0% (0/3)	100% (3/3)	0.0% (0/3)
Cav1.3	Breast without alteration	100.0% (11/11)	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)	0.0% (0/11)
	Ductal hyperplasia	66.6% (8/12)	8.3% (1/12)	8.3% (1/12)	16.6% (2/12)
	Ductal carcinoma <i>in situ</i>	50.0% (3/6)	16.6% (1/6)	16.6% (1/6)	16.6% (1/6)
	Invasive ductal carcinoma	16.6% (1/6)	16.6% (1/6)	33.3% (2/6)	33.3% (2/6)

Table 4 Percentage of cases with membranar immunostaining categorized in no expression, <25%, 25% a 50%, or <50% of Cav1.2 and Cav1.3 immunostaining.

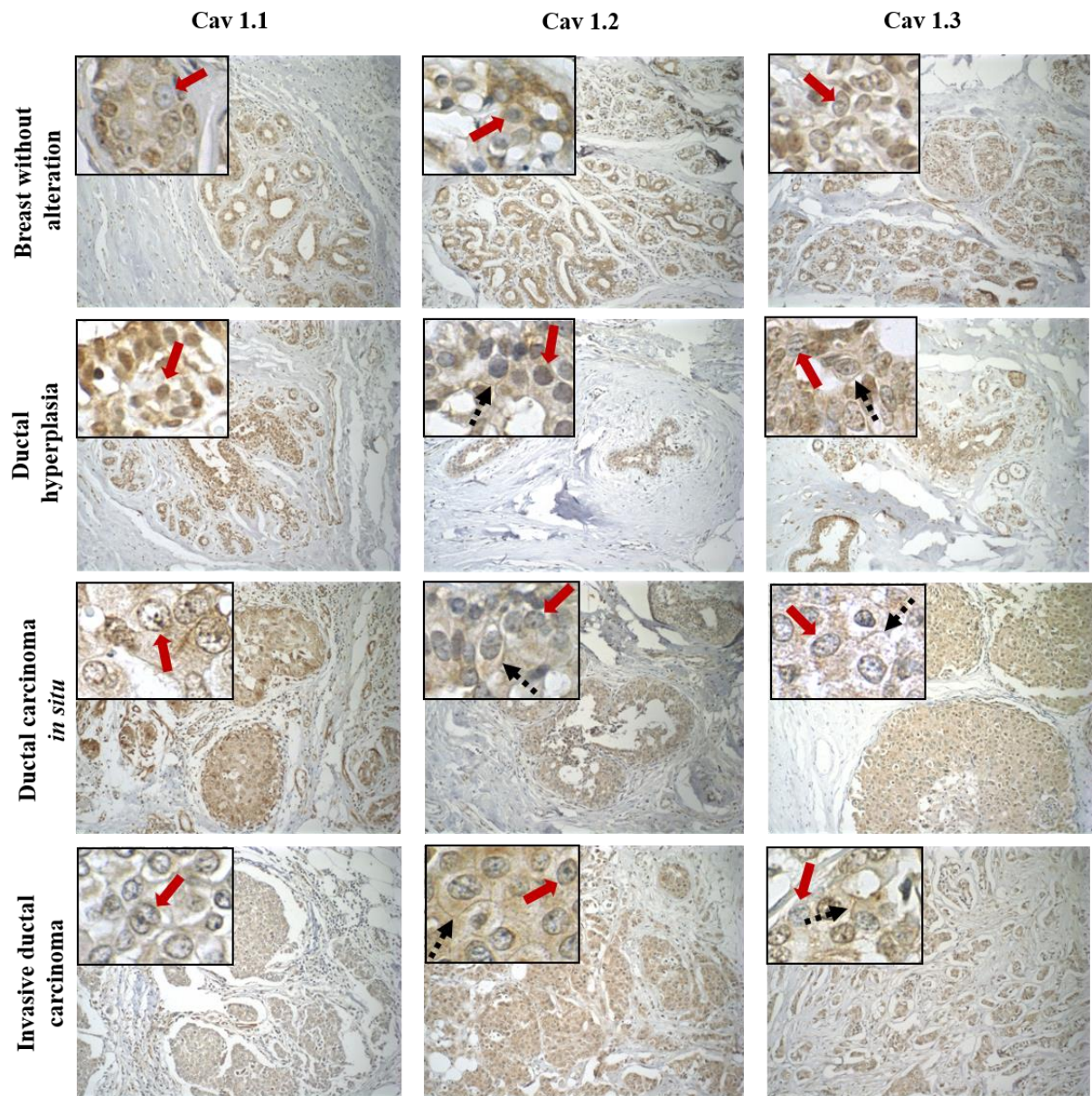


Fig 1. Human mammary glands with immunostaining for Cav_v1.1, Cav_v1.2 and Cav_v1.3. Identified by DAB chromogen and counterstained with hematoxylin. 200x magnification and 600x insert. Continuous arrows indicate nuclear immunoreactive. Dotted arrows indicate membrane immunostaining.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo e nas condições metodológicas empregadas, podemos concluir que:

- Todas as classificações histológicas estudadas (epitélio mamário humano sem alteração; hiperplasia ductal; carcinoma ductal *in situ*; carcinoma ductal invasor) apresentam expressão proteica de Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3.
- A expressão proteica dos canais utilizados pode ser observada principalmente no núcleo e no citoplasma das células estudadas, e em menor quantidade na membrana citoplasmática, indicando o desempenho de funções que não o influxo de Ca^{2+} vindo no meio extracelular
- As etapas de transformação neoplásica para o carcinoma ductal invasor mostraram correlação negativa com a expressão nuclear dos canais Cav1.3, assim como todas as isoformas da família Cav3. Ao oposto, a expressão citoplasmática de Cav1.1, Cav3.1 e Cav3.2 obteve correlação positiva, assim como a expressão membranar de Cav1.2 e Cav1.3.
- Em Cav3.1 foi vista uma correlação negativa entre a marcação citoplasmática e a marcação nuclear, enquanto em Cav1.1, essa correlação foi positiva.
- A presença da expressão desses canais, exceto Cav1.2, com maior intensidade no núcleo das células não neoplásicas parece estar relacionado com a transformação neoplásica, uma vez que há perda dessa expressão nas classificações histológicas mais avançadas.
- O aumento da expressão de Cav3.1 e Cav3.2 no citoplasma e de Cav1.2 e Cav1.3 na membrana, a medida em que há um avanço no modelo de transformação neoplásica em etapas indica possível relação com a transformação neoplásica em células epiteliais mamárias.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração intracelular de Ca^{2+} é fundamental na regulação de diversas funções celulares, inclusive processos como proliferação, apoptose e transcrição gênica, que geralmente encontram-se alterados nas células neoplásicas. Além disso, a sinalização de Ca^{2+} no tumor pode contribuir com a geração de um microambiente tumoral favorável, auxiliando a disseminação de fatores de crescimento e a ocorrência de hipoxia. Para que a homeostase desse íon seja mantida, e que a sua sinalização ocorra de forma equilibrada com as necessidades celulares, há atuação de canais, bombas ou transportadores que podem estar localizados na membrana plasmática ou na membrana de organelas intracelulares.

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e do tipo T estão incluídos nas estruturas responsáveis pelo influxo desse íon e a partir de estudos que identificaram alterações na expressão de RNAm desses canais em diversas neoplasias, inclusive em câncer de mama, sua expressão em tumores começou a ser associada com a proliferação, apoptose e migração em neoplasias mamárias. Extrapolando a possível relação com as neoplasias, havia o questionamento se essas expressões, em lesões com comportamento pré-neoplásico, poderiam estar relacionadas à transformação neoplásica. Nossos resultados demonstraram a presença desses canais em lesões precursoras do carcinoma ductal invasor de mama humana (hiperplasias ductais e carcinomas ductais *in situ*), sugerindo que, alterações na expressão proteica e na localização subcelular podem ser fatores associados à transformação neoplásica.

De forma curiosa, em todas as regiões histológicas analisadas (glândula mamária sem alteração, hiperplasia ductal, carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasor), observamos uma maior expressão proteica desses canais no núcleo e no citoplasma das células, indicando que podem ter papel no transporte de cálcio nessas regiões, contribuindo com a sinalização e a ocorrência de diferentes funções. Além disso, suas proteínas estruturais podem ser capazes de se ligar a proteínas nesses locais, modulando processos que estão relacionados à transformação neoplásica.

Portanto, estudos que visem compreender melhor as funções que podem ser moduladas por esses canais em suas diversas localizações subcelulares são de grande valia para investigar o papel dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem na transformação neoplásica. Podendo ser alvo de novas terapias, visto que já existem fármacos capazes de bloqueá-los, e serem marcadores precoces de lesões com comportamento pré neoplásico, estudos funcionais desses canais devem ser explorados no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTAL, L.; MARTIN-CARABALLO, M. T-type calcium channels in cancer. **Cancers**, v. 11, n. 2, 2019.
- ARCANGELI, A. *et al.* Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 66-93, 2009.
- AUBELE, M. *et al.* Accumulation of chromosomal imbalances from intraductal proliferative lesions to adjacent in situ and invasive ductal breast cancer. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 9, n. 1, 2000.
- BADVE, S.; GÖKMEN-POLAR, Y. Ductal carcinoma in situ of breast: update 2019. **Pathology**, v. 51, n. 6, p. 563-569, 2019.
- BANDYOPADHYAY, S.; BLUTH, M.; ALI-FEHMI, R. Breast Carcinoma: Updates in Molecular Profiling. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 38, n. 2, p. 401-420, 2018.
- BASSON, M. *et al.* Increased extracellular pressure stimulates tumor proliferation by a mechanosensitive calcium channel and PKC- β . **Molecular oncology**, v. 9, p. 513-526, 2015.
- BECCHETTI, A. Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 301, n. 2, p. 255-265, 2011.
- BERRIDGE, M.; BOOTMAN, M.; RODERICK, L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 517-529, 2003.
- BERTOLESI, G. *et al.* The Ca²⁺ Channel Antagonists Mibefradil and Pimozide Inhibit Cell Growth via Different Cytotoxic Mechanisms. **Molecular pharmacology**, v. 62, p. 210-219, 2002.
- BOROWIEC, A. *et al.* Are Orai1 and Orai3 channels more important than calcium influx for cell proliferation? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, p. 464-472, 2004.
- BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p.394-424, 2018.
- BROULAND, J. *et al.* The Loss of Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium Transport ATPase 3 Expression Is an Early Event during the Multistep Process of Colon Carcinogenesis. **Tumorigenesis and Neoplastic Progression**, v. 167, n. 1, p. 233-242, 2005.
- BUCHANAN, P.; MCCLOSKEY, K. Ca_v channels and cancer: canonical functions indicate benefits of repurposed drugs as cancer therapeutics. **European Biophysics Journal**, v. 45, n. 7, p. 621-633, 2016.
- CAPIOD, T. Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. **Biochimie**, v. 93, p. 2075-2079, 2011.
- CAPIOD, T. The need for calcium channels in cell proliferation. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 8, p. 7-14, 2013.

CAPIOD, T. Extracellular calcium has multiple targets to control cell proliferation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 898, p.133-56, 2016.

CARRARO, D.; ELIAS, E.; ANDRADE, V. Ductal carcinoma in situ of the breast: morphological and molecular features implicated in progression. **Bioscience Reports**, v. 34, n. 1, p. 19-28, 2014.

CATTERALL, W. Voltage-Gated Calcium Channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 8, 2011.

CHEANG, M. *et al.* Ki67 index, her2 status, and prognosis of patients with luminal b breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHEN, R. *et al.*, Cav1.3 channel $\alpha 1D$ protein is overexpressed and modulates androgen receptor transactivation in prostate cancers. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 5, p. 524-536, 2014.

COLLEMAN, W. Breast ductal carcinoma in situ: precursor to invasive breast cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 5, p. 942-945, 2019.

COLLINS, L. *et al.* Magnitude and laterality of breast cancer risk according to histologic type of atypical hyperplasia: results from the nurses' health study. **Cancer**, v. 109, n. 2, p. 180-187, 2007.

COLLINS, L. Precursor lesions of the low-grade breast neoplasia pathway. **Surgical Pathology Clinics**, v. 11, n. 1, p. 177-197, 2018.

DELIOT, N.; CONSTANTIN, B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p. 2512-2522, 2015.

DOLPHIN, A. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 19, p. 5369-5390, 2016.

DUPONT, W.; PAGE, D. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p. 146-151, 1985.

EAST, E.; CARTER, C.; KLEER, C. Atypical ductal lesions of the breast: criteria, significance, and laboratory updates. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 142, n. 10, p. 1182-1185, 2018.

ELIYATKIN, N. *et al.* Molecular classification of breast carcinoma: from traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. **The Journal of Breast Health**, v. 11, n. 2, p. 59-66, 2015.

FAOUZI, M. *et al.* Down-regulation of orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 2, p. 542-551, 2010.

FLOURAKIS, M. *et al.* Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. **Cell Death & Disease**, 2010.

- GANNON, L.; COTTER, M.; QUINN, C. The classification of invasive carcinoma of the breast. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 13, n. 8, p. 941-954, 2013.
- GARIB, V. *et al.* Propofol-induced calcium signalling and actin reorganization within breast carcinoma cells. **European Journal of Anaesthesiology**, v.22, p. 609-615, 2005.
- GOING, J. Stages on the way to breast cancer. **The Journal of Pathology**, v. 199, n. 1, p. 1-3, 2003.
- GOOBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 463-474, 2012.
- GRAY, L.; SCHIFF, D.; MACDONALD, T. A model for the regulation of T-type Ca²⁺ channels in proliferation: roles in stem cells and cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 13, n. 5, p. 589-595, 2012.
- HARTMANN, L. *et al.* Understanding the premalignant potential of atypical hyperplasia through its natural history: A longitudinal cohort study. **Cancer Prevention Research**, v. 7, n. 2, p. 211-217, 2014.
- HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the Human Mammary Gland: Current Status of Knowledge. **Clinical Anatomy**, v. 26, n. 1, p. 29-48, 2012.
- HARVEY, J. *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 17, n. 5, p. 1474-1481, 1999.
- HONG, Y. *et al.* Ductal carcinoma in situ current trends, controversies, and review of literature. **American Journal of Surgery**, v. 216, n. 5, p. 998-1003, 2018.
- HUMEAU, J. *et al.* Calcium signaling and cell cycle: progression or death. **Cell Calcium**, v. 70, p. 3-15, 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2019. E-book. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> . Acesso em: 22 jun. 2020.
- JACQUEMET, G. *et al.* L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. **Nature Communications**, v. 7, n. 13297 2016.
- KADER, T. *et al.* Atypical ductal hyperplasia: update on diagnosis, management, and molecular landscape. **Breast Cancer Research**, v. 20, n. 39, 2018.
- KANWAR, N. *et al.* Amplification of a calcium channel subunit CACNG4 increases breast cancer metastasis. **EBioMedicine**, v. 52, 2020.
- LEAL-ESTEBAN, L.; FAJAS, L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, 2020.

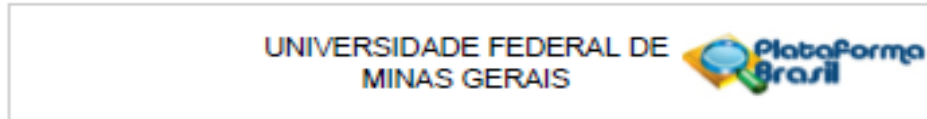
- LEE, W.; MONTEITH, G.; ROBERTS-THOMSON, S. Calcium transport and signaling in the mammary gland: Targets for breast cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1765, p. 235-255, 2006.
- LOPEZ-GARCIA, M. *et al.* Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology**, v. 57, n. 2, p.171-192, 2010.
- MA, X. *et al.* Gene expression profiles of human breast cancer progression. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5974-5979, 2003.
- MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, p. 23-31, 2015.
- MARDEKIAN, S.; BOMBONATI, A.; PALAZZO, J. Ductal carcinoma in situ of the breast: the importance of morphologic and molecular interactions. **Human Pathology**, v. 46, p. 114-123, 2016.
- MARQUES, R. *et al.* 5 α -Dihydrotestosterone regulates the expression of L-type calcium channels and calcium-binding protein regucalcin in human breast cancer cells with suppression of cell growth. **Medical Oncology**, v. 32, n. 228, 2015.
- MARTIN, N.; BERNARD, D. Calcium signaling and cellular senescence. **Cell Calcium**, v. 70, p.16-23, 2018.
- MATSON, J.; COOK, J. Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. **FEBS Journal**, v. 284, n. 3, p.362–375, 2017.
- MEISNER, A.; FEKRAZAD, M.; ROYCE, M. Breast Disease: Benign and Malignant. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 5, p. 1115-1114, 2008.
- MENES, T. *et al.* Subsequent breast cancer risk following diagnosis of atypical ductal hyperplasia on needle biopsy. **JAMA oncology**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2017.
- MONTEITH, G. *et al.* Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 519-530, 2007.
- MONTEITH, G.; PREVARSKAYA, N.; ROBERTS-THOMSON, S. The calcium–cancer signalling nexus. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, p. 373-380, 2017.
- MORI, I.; YANG, Q.; KAKUDO, K. Predictive and prognostic markers for invasive breast cancer. **Pathology International**, v. 52, v. 3, p. 186-194, 2002.
- NEAL, L. *et al.* Diagnosis and Management of Benign, Atypical, and Indeterminate Breast Lesions Detected on Core Needle Biopsy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 4, p. 536-547, 2014.
- OHKUBO, T. YAMAZAKI, J. T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. **International journal of oncology**, v. 41, p.267-275, 2012.
- ORR, B.; KELLEY, J. Benign Breast Diseases: Evaluation and Management. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 59, n. 4, p. 710-726, 2016.

- PAGE, D. *et al.* Atypical hyperplastic lesions of the female breast: a long-term follow-up study. **Cancer**, v. 55, n. 11, p. 2698-2708, 1985.
- PANNER, A. *et al.* Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. **Cell Calcium**, v. 31, n. 2, p. 105-119, 2005.
- PETERS, A. *et al.* Calcium channel TRPV6 as a potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 10, p. 2158-2168, 2012.
- PHAN, N. *et al.* Voltage-gated calcium channels: novel targets for cancer therapy. **Oncology Letters**, v. 14, p.2059-2074, 2017.
- PINDER, S.; ELLIS, I. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: Ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH) — current definitions and classification. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 254-257, 2003.
- PITT, G.; MATSUI, M.; CAO, C. Voltage-gated calcium channels in nonexcitable Tissues, **Annual Review of Physiology**, v. 83, 2021.
- ROSENDO-PINEDA, M.; MORENO, C.; VACA, L. Role of ion channels during cell division. **Cell Calcium**, v. 91, 2020.
- ROSS, D.; WEN, Y.; BROGI, E. Ductal carcinoma in situ: morphology-based knowledge and molecular advances. *Advances in Anatomic Pathology*, v. 20, n. 4, p. 205-216, 2003.
- RUSSO, J.; RUSSO, I. Development of the human breast. **Maturitas**, v.49, n. 1, p. 2-15, 2004.
- SALAMAT, F. *et al.* Subtypes of Benign Breast Disease as a Risk Factor of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta Analyses. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 355-364, 2018.
- SANATI, S. Morphologic and molecular features of breast ductal carcinoma in situ. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 5, p.946-955.
- SANTISTEBAN, M. *et al.* Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast cancer in atypical hyperplasia. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 2, p. 431-437, 2010.
- SEWEEL, C. Pathology of high-risk breast lesions and ductal carcinoma in situ. **Radiologic Clinics of North America**, v. 42, n. 5, p. 821-830, 2004.
- SHAABAN, A. *et al.* Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor and ki-67 expression. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, 2002.
- SHEA, E.; KOH, V.; TAN, P. Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. **Pathology International**, v. 70, n. 5, p.242-252, 2020.
- SILVA, N. Breast development and disorders in the adolescent female. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 48, p. 40-50, 2018.
- SIMMS, B.; ZAMPONI, G. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. **Neuron**, v. 82, n. 1, p. 24-45, 2014.

- SIMPSON, P. *et al.* Molecular evolution of breast cancer. **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 248-254, 2005.
- SIMPSON, J.; BOULOS, F. Differential diagnosis of proliferative breast lesions. **Surgical Pathology Clinics**, v. 2, n. 2, p. 235-246, 2009.
- TAYLOR, J. *et al.* Selective blockade of T-type Ca²⁺ channels suppresses human breast cancer cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 267, p. 116–124, 2008.
- VOGEL, V. Atypia in the Assessment of Breast Cancer Risk: Implications for Management. **Diagnostic Cytopathology**, v. 30, n. 3, p. 151-157, 2004.
- VOGELSTEIN, B. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 9, p. 525-532, 1988.
- WALDMAN, R. *et al.* Skin diseases of the breast and nipple: Benign and malignant tumors. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 6, p. 1467-1481, 2019.
- WANG, C. *et al.* Meta-analysis of public microarray datasets reveals voltage-gated calcium gene signatures in clinical cancer patients. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, 2015.
- WATKINS, E. Overview of breast cancer. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, v.32, n. 10, p. 13-17, 2019.
- WEISS, N.; ZAMPONI, G. T-type calcium channels: from molecule to therapeutic opportunities. **International journal of biochemistry and cell biology**, v. 108, p. 34-39, 2019.
- WELLINGS, S.; JENSEN, H. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 50, n. 5, p.1111-1118, 1973.
- WENZEL, E.; SINGH, A. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. **In vivo**, v. 32, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Cancer Observatory**. 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- WORSHAM, M. *et al.* Breast cancer incidence in a cohort of women with benign breast disease from a multiethnic, primary health care population. **The Breast Journal**, v. 31, n. 2, p. 115-121, 2007.
- ZAMPONI, G. *et al.* The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p.821-870, 2015.
- ZHU, H. *et al.* Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca²⁺ oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v.5, n. 11, p. 2455-2471, 2014.

ANEXO

Anexo A Parecer consubstanciado do CEP Universidade Federal de Minas Gerais



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão de canais de Ca^{2+} e Na^{+} dependentes de voltagem em alterações epiteliais proliferativas de mama humana.

Pesquisador: Enio Ferreira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 33481919.4.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.377.225

Apresentação do Projeto:

O câncer de mama é a principal neoplasia entre as mulheres, totalizando os maiores índices de incidência e mortalidade em todo o mundo. A participação dos canais iônicos no desenvolvimento dessa patologia tem sido investigada, com a apresentação de indícios que sugerem a sua participação na progressão do tumor. Diferentes estudos têm relatado o envolvimento de canais de Ca^{2+} e Na^{+} dependentes de voltagem com o aumento da proliferação celular e da agressividade tumoral em lesões de mama. A fim de investigar essa relação será desenvolvido um trabalho utilizando lesões de mama humana armazenadas em bloco de parafina, oriundas do Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, coletados entre o período de 2000 e 2010, destinados somente para pesquisa e divulgação científica sem fins comerciais ou divulgação de dados clínicos das pacientes. Será feita imunohistoquímica desse material, utilizando marcadores para os canais de Ca^{2+} e Na^{+} dependentes de voltagem e para marcadores de proliferação celular e transição epitélio-mesênquima. Pretendemos, a partir dessa proposta, iniciar projetos visando verificar o papel desses canais no desenvolvimento, progressão e na transição epitélio mesênquima em lesões proliferativas neoplásicas e não neoplásicas da mama.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 8527 2ª Ad. 31205-901
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4892 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.377.225

Identificar e determinar a relação entre a expressão proteica dos canais de Ca²⁺ e Na⁺

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto apresenta de risco mínimo visto que o material a ser estudado será somente aqueles obtidos de blocos de parafina. Esse material deve possuir tecido suficiente para análise histológica sem perda completa do material embocado, não serão utilizados qualquer tipo de informação clínica no paciente e o estudo se baseia em uma análise molecular sem ligação clínica direta com os indivíduos envolvidos.

Benefícios:

Através do presente trabalho será possível visar um melhor entendimento da etiologia e fisiopatologia do câncer, bem como o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e de tratamentos mais eficazes utilizando os canais iônicos dependentes de voltagem.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande importância para a área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentado Termo de Constituição de Biorrepositório e TCUD.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado após a apresentação dos documentos solicitados.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 05 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	13/10/2020		Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad Sl 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.377.225

Básicas do Projeto	ETO_1333627.pdf	17:19:43		Aceito
Outros	Retomo_CEP.pdf	13/10/2020 17:19:03	Enio Ferreira	Aceito
Outros	Termo_consentimento_laboratorio.pdf	13/10/2020 17:12:07	Enio Ferreira	Aceito
Outros	TCUD_e_Biorrepositorio.pdf	13/10/2020 17:09:11	Enio Ferreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	16/09/2020 10:37:01	Enio Ferreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_departamento_pg_2.pdf	02/06/2020 11:11:12	Enio Ferreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_departamento_pg_1.pdf	02/06/2020 11:11:04	Enio Ferreira	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Dispensa_TCUD.pdf	02/06/2020 11:08:33	Enio Ferreira	Aceito
Folha de Rosto	Folho_de_rosto.pdf	11/12/2019 13:14:13	Enio Ferreira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

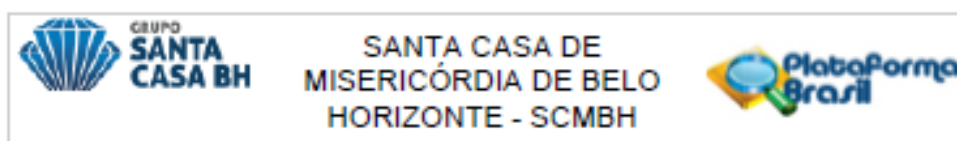
BELO HORIZONTE, 03 de Novembro de 2020

Assinado por:

Crista Carem Palva Fontalhinha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/ 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4502 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo B Parecer consubstanciado do CEP Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão de canais de Ca^{2+} e Na^{+} dependentes de voltagem em alterações epiteliais proliferativas de mama humana.

Pesquisador: Erlo Ferreira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 33481919.4.3001.5138

Instituição Proponente: Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa BH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.505.366

Apresentação do Projeto:

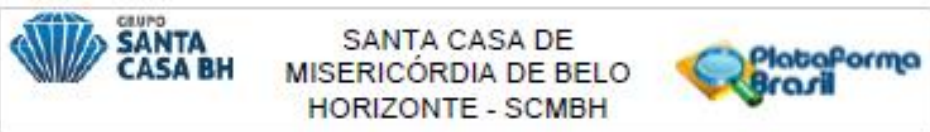
Resumo: O câncer de mama é a principal neoplasia entre as mulheres, totalizando os maiores índices de incidência e mortalidade em todo o mundo. A participação dos canais iônicos no desenvolvimento dessa patologia tem sido investigada, com a apresentação de indícios que sugerem a sua participação na progressão do tumor. Diferentes estudos têm relatado o envolvimento de canais de Ca^{2+} e Na^{+} dependentes de voltagem com o aumento da proliferação celular e da agressividade tumoral em lesões de mama. A fim de investigar essa relação será desenvolvido um trabalho utilizando lesões de mama humana armazenadas em bloco de parafina, oriundas do Hospital Santa Casa BH, coletados entre 2010 a 2015, destinados somente para pesquisa e divulgação científica sem fins comerciais ou divulgação de dados clínicos das pacientes. Será feita imunohistoquímica desse material, utilizando marcadores para os canais de Ca^{2+} e Na^{+} dependentes de voltagem e para marcadores de proliferação celular e transição epitélio mesênquima. Pretendemos, a partir dessa proposta, iniciar projetos visando verificar o papel desses canais no desenvolvimento, progressão e na transição epitélio mesênquima em lesões proliferativas neoplásicas e não neoplásicas da mama.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar e determinar a relação entre a expressão proteica dos canais de Ca^{2+} e Na^{+}

Endereço: Rua Álvares Maciel 611
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 Fax: (31)3238-8933 E-mail: comitedeetica@santacasabh.org.br



Continuação do Parecer: 4.526.300

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 21 de Janeiro de 2021

Assinado por:
Sarah Melo Gontijo Houara
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Álvares Maciel 611
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8033 Fax: (31)3238-8033 E-mail: comitedeetica@santacasabh.org.br

Página 04 de 04