

Paula Rhana Queiroz Araújo

**Canais de Na⁺ dependentes de voltagem atuam no
desenvolvimento de tumores da mama.**

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2018

PAULA RHANA QUEIROZ ARAÚJO

**CANAIS DE Na⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM ATUAM
NO DESENVOLVIMENTO DE TUMORES DA MAMA.**

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

ORIENTADOR:

Jader dos Santos Cruz, Ph.D.

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

CO-ORIENTADOR:

Andréia Laura Prates Rodrigues, Ph.D.

Universidade FUMEC, Belo Horizonte, MG, Brasil.

BELO HORIZONTE

2018

- 043 Araújo, Paula Rhana Queiroz.
Canais de Na^+ dependentes de voltagem atuam no desenvolvimento de tumores da mama [manuscrito] / Paula Rhana Queiroz Araújo. – 2018.
83 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Jader dos Santos Cruz. Co-Orientador: Andréia Laura Prates Rodrigues.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Canais Iônicos. 4. Canais de Sódio. I. Cruz, Jader dos Santos. II. Rodrigues, Andréia Laura Prates. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



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



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PAULA RHANA QUEIROZ ARAUJO. Aos dezesseis dias do mês de fevereiro de 2018 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Canais de Na⁺ dependentes de voltagem atuam no desenvolvimento de tumores da mama"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Jader dos Santos Cruz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Sandra Lauton Santos (Universidade Federal de Sergipe), aprovada; Dr. Christopher Kushmerick (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Andreia Laura Prates Rodrigues - Coorientadora (Universidade FUMEC), aprovada; Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2018.

Sandra Lauton Santos

Dra. Sandra Lauton Santos (Universidade Federal de Sergipe)

Chris Kushmerick

Dr. Christopher Kushmerick (UFMG)

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

Jader dos Santos Cruz
 Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador (UFMG)

Jader dos Santos Cruz
 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Sub-Coordenador do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jader dos Santos Cruz e Dra. Andréia Laura Prates Rodrigues pela orientação ao longo dessa jornada, pela amizade, companheirismo e confiança. Obrigada por tudo!

Ao Dr. Ênio Ferreira, do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e sua aluna de doutorado Tatiany Silveira pelo apoio;

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

À minha família pelo apoio e amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado. Obrigada por compreenderem minha ausência em muitos momentos e todo o stress desses últimos meses. AMO VOCÊS!

Aos queridos amigos que fiz durante essa caminhada: Narciso, Artur, Tati, Evaldo, Diego, Fábio, Verônica, Bárbara, Priscila, Tonton, Jéssica, galerinha de Bases... sem vocês essa experiência não teria sido tão divertida. Obrigada pelas risadas garantidas!

A todos os colegas do Laboratório de Membranas Excitáveis e de Biologia Cardiovascular (ICB-UFMG) e do Laboratório de Pesquisa em Câncer de Mama, Canais Iônicos e AMPc (Universidade FUMEC). Obrigado por todos os momentos vividos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG), à Universidade FUMEC e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo suporte financeiro e técnico que permitiram a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O câncer de mama é a principal neoplasia entre as mulheres, totalizando os maiores índices de incidência e mortalidade em todo o mundo. Devido a sua grande importância na saúde pública mundial, a busca por novas formas de diagnóstico e de terapias mais eficientes contra esta patologia se tornou objeto de estudo de diversos grupos ao redor do mundo. Recentemente, a participação de canais iônicos no desenvolvimento de tumores tem sido investigada. Os canais de Na⁺ dependentes de voltagem são proteínas transmembrana importantes para a excitabilidade celular; alterações em seu funcionamento e expressão são normalmente associados a patologias cardíacas e neurológicas. Entretanto, diferentes estudos têm relatado o envolvimento desses canais com o aumento da agressividade tumoral em neoplasias da mama. O presente trabalho buscou avaliar a presença desses canais em células de tumores primários de mama, buscando indícios da possível participação dessas proteínas nas etapas iniciais do processo de tumorigênese. Os resultados demonstraram a presença de correntes de influxo produzidas por canais de Na⁺ dependentes de voltagem para ambas as linhagens de tumor primário. Além disso, identificou-se a presença de canais do tipo Nav1.5 e Nav1.7, que estavam expressos não apenas na membrana dessas células, mas também na membrana nuclear e em seu citoplasma. Ao final deste trabalho foi possível concluir que os canais de Na⁺ dependentes de voltagem estão presentes, ao contrário do que se pensava, em estágios mais iniciais do desenvolvimento tumoral, indicando a participação desses canais em processos importantes para o estabelecimento do tumor. Além disso, observamos que estes canais estão presentes em grande parte do ambiente subcelular, o que foi associado a possível participação destes canais em outros processos celulares que não estejam ligados à permeabilidade iônica.

Palavras-chave: Câncer de mama; Canais iônicos; Canais de sódio; Agressividade tumoral.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer of women, with high numbers of incidence and mortality worldwide. Due to its great importance in world public health, the search for new forms of diagnosis and more effective therapies has become the object of study of several groups around the world. Recently, the role of ion channels in the development of different type of tumors has been investigated. Voltage-gated Na⁺ channels are transmembrane proteins important for cellular excitability and defects in its function or expression is usually associated with cardiac and neurological conditions. However, different studies have reported the involvement of these channels with the increase of tumor aggressiveness in breast neoplasms. The present work aimed to evaluate the presence of these proteins in primary breast cancer cells, searching for a possible participation of these proteins in the initial stages of the tumorigenesis process. The results demonstrated the presence of influx currents produced by voltage-gated Na⁺ channels for both primary tumor cell lines. In addition, we identified the presence of Nav1.5 and Nav1.7 channels, which were expressed not only on the membrane of these cells, but also on the nuclear membrane and its cytoplasm. At the end of this study, it was possible to conclude that the voltage-gated Na⁺ channels are present in earlier stages of tumor development, instead to what was thought, indicating the participation of these channels in processes important for the establishment of the tumor. In addition, was observed that these channels are present in almost the entire subcellular environment, which was associated with the possible participation of these channels in other cellular processes that are not related to the ion permeability.

Key words: Breast cancer; Ion channels; Sodium channels; Tumor aggressiveness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – O desenvolvimento do tumor.....	16
Figura 02 – Principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral.....	18
Figura 03 – Etapas envolvidas na disseminação tumoral via circulação sanguínea.....	19
Figura 04 – Número estimado de casos incidentes e mortes por câncer, em mulheres, no mundo durante o ano de 2012.....	23
Figura 05 – Dez tipos de câncer de maior incidência no Brasil.....	24
Figura 06 – Estrutura anatômica da mama e principais lesões.....	26
Figura 07 – Alterações proliferativas da mama.....	29
Figura 08 – Representação topológica dos canais de Na ⁺ dependentes de voltagem.....	34
Figura 09 – Registros eletrofisiológicos de células saudáveis e tumorais da mama.....	39
Figura 10 – Diferenças estruturais entre as isoformas adulta e neonatal do Nav1.5.....	41
Figura 11 – Traçado representativo do protocolo para a obtenção da relação I x V.....	47
Figura 12 – Traçados representativos obtidos para as linhagens normal e tumorais da mama.....	52
Figura 13 – Registros eletrofisiológicos para MACL-1 e MGSO-3.....	53
Figura 14 – Análise comparativa dos resultados obtidos para MACL-1 e MGSO-3.....	55
Figura 15 – Inibição dos VGSC por tetrodotoxina.....	58
Figura 16 – Expressão de Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 em diferentes linhagens celulares de mama.....	60
Figura 17 – Imagens representativas dos controles positivo e negativo para a técnica de imunohistoquímica.....	62

Figura 18 – Imagens representativas da imunohistoquímica para detecção do Nav1.5..63

Figura 19 – Imagens representativas da imunohistoquímica para detecção do Nav1.6..65

Figura 20 – Imagens representativas da imunohistoquímica para detecção do Nav1.7..66

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Genes, expressão tecidual e sensibilidade à tetrodotoxina para os canais de Na ⁺ dependentes de voltagem.....	35
Tabela 02 – Distribuição dos VGSC entre os tipos de câncer já relatados na literatura....	38
Tabela 03 – Anticorpos primários utilizados para <i>western-blot</i>	49
Tabela 04 – Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica.....	51
Tabela 05 – Compilação dos resultados obtidos pela análise microscópica da imunohistoquímica para Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	anticorpo
ATP	adenosina trifosfato
CDIS	carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLIS	carcinoma lobular <i>in situ</i>
DAB	diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
HBV	vírus da hepatite B
HCV	vírus da hepatite C
HER2	fator de crescimento epidérmico humano
HPV	papilomavírus humano
Ig	imunoglobulina
IHQ	imunohistoquímica
I_{Na}	corrente de sódio
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinases de matriz
NHE-1	isoforma 1 do trocador Na^+/H^+
nNav1.5	isoforma neonatal do canal Nav1.5
PVDF	fluoreto de polivinilideno
RE	receptor de estrogênio
RNA	ácido ribonucleico
RP	receptor de progesterona

TTX	tetrodotoxina
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VGSC	canais de sódio dependentes de voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 CÂNCER.....	15
1.1.1 Etiologia e fisiopatologia do câncer.....	15
1.1.2 Fatores de risco.....	21
1.2 CÂNCER DE MAMA.....	23
1.2.1 Anatomia da mama.....	24
1.2.2 Diagnóstico.....	26
1.2.3 Classificação dos tumores mamários.....	27
1.2.4 Linhagens celulares.....	29
1.2.5 Tratamento.....	30
1.3 CANAIS IÔNICOS.....	32
1.3.1 Canais de Na ⁺ dependentes de voltagem.....	32
1.3.2 Canais de Na ⁺ e câncer de mama.....	37
2 JUSTIFICATIVA.....	43
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4 MÉTODOS.....	45
4.1 CULTURA CELULAR.....	45
4.2 ELETROFISIOLOGIA.....	45
4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	47
4.3.1 Ativação dos canais de Na ⁺ dependentes de voltagem.....	47
4.4 WESTERN-BLOT.....	48
4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	50
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 AS LINHAGENS MACL-1 E MGSO-3 APRESENTAM CORRENTES DE ENTRADA COM PROPRIEDADES SEMELHANTES ÀS PRODUZIDAS POR CANAIS DE Na⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM.....	52

5.2 AS CÉLULAS MACL-1 E MGSO-3 DIFEREM QUANTO A POPULAÇÃO DE VGSC EXPRESSOS EM SUA MEMBRANA CELULAR.....	56
5.3 5.3 OS CANAIS DE Na ⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM ESTÃO LOCALIZADOS EM DIFERENTES COMPARTIMENTOS CELULARES.....	61
6 DISCUSSÃO.....	68
7 CONCLUSÃO.....	73
8 REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Qual a origem da palavra câncer? Câncer foi um termo cunhado por Hipócrates (470-360 a.C) e que, em latim, significa “caranguejo” (Akram e Siddiqui, 2012; Faguet, 2015). Passou a ser comumente utilizada para se referir aos diferentes tipos de tumores malignos, uma vez que estes são capazes de aderir a qualquer região que estejam. Estes tumores ou neoplasmas, como também são conhecidos, são caracterizados por uma massa tecidual amorfa, onde as células apresentam uma taxa de proliferação aumentada, completamente desordenada e sem controle, mesmo após o fim do estímulo que originou estas alterações (Wilson e Waugh, 2006).

Os tumores (usarei câncer, neoplasia e tumor de forma indistinguível ao longo deste texto) podem ser divididos em benignos e malignos, dependendo da capacidade de invasão e agressividade das células que os constituem. As neoplasias podem estar presentes nos mais diferentes órgãos e tecidos, e hoje constituem um importante grupo para os estudos epidemiológicos devido a sua alta incidência e mortalidade (Majeed *et al.*, 2014).

1.1.1 Etiologia e fisiopatologia do câncer

O processo de formação do tumor (**Figura 1**), conhecido como tumorigênese, tem início na transformação de células saudáveis em células neoplásicas. Essa transformação pode ser deflagrada por diversos fatores, referidos como carcinogênicos, e os quais discutiremos mais adiante. De maneira geral, a exposição a estes fatores ocorre ao longo da vida do indivíduo, causando pequenas modificações no genoma das células. Após vários episódios de exposição e com o acúmulo de mutações no DNA, algumas funções de controle celular são alteradas e culminam na desregulação dos processos de proliferação, ciclo celular e apoptose (Hanahan e Weinberg, 2000).

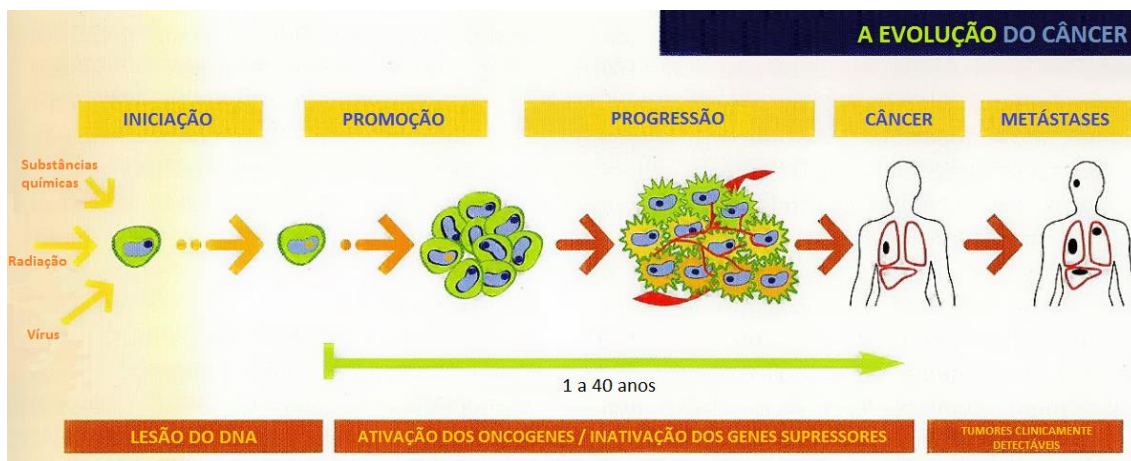


Figura 1. O desenvolvimento de um tumor. O processo de formação do tumor pode ser dividido em etapas que começam pela transformação maligna de uma célula saudável e pode chegar até a formação de novos sítios neoplásicos (metástase). Fonte: modificado de Béliveau e Gingras (2007).

As células saudáveis apresentam uma rede complexa de genes que trabalham de maneira harmônica para garantir o funcionamento e o controle de diferentes processos celulares, como o crescimento, proliferação e morte celular. Entre estes, destacam-se: 1) os proto-oncogenes, promotores do crescimento celular; 2) os genes supressores de tumor, que inibem o crescimento; 3) os genes responsáveis por regular o processo de apoptose (morte celular programada); e 4) os genes que estão envolvidos no reparo do DNA, que constantemente examinam erros na informação genética e evitar, portanto, uma transformação que possa ser neoplásica. Estes são os principais alvos de um dano genético não letal, mas que, perante o acúmulo de mutações múltiplas, acabam levando ao desenvolvimento e instalação da doença (Hanahan e Weinberg, 2000; Stratton, Campbell e Futreal, 2009; Steward e Wild, 2014).

Uma vez transformada, a célula (agora conhecida como tumoral) passa por um processo de expansão clonal, onde é observado um aumento exacerbado da proliferação e que culmina, portanto, na formação do tumor. Entretanto, a caracterização dos tumores é baseada em suas características morfológicas e moleculares. As neoplasias benignas normalmente se apresentam de forma localizada e

bem delimitada, com células bem diferenciadas (se assemelhando ao tecido de origem) e com um perfil de crescimento lento (Kumar *et al.*, 2010).

Já as neoplasias malignas apresentam uma massa tecidual mais infiltrada nos tecidos adjacentes, com células pouco diferenciadas e com uma estrutura atípica ao tecido em que se encontra. A taxa de crescimento celular neste caso é bastante variável, podendo ser lenta ou rápida; entretanto, a presença de novas lesões tumorais que se encontram distantes do sítio primário, processo denominado metástase, é bastante frequente nestes tumores (Rakha *et al.*, 2010; Makki, 2015).

A velocidade na qual a população de células tumorais aumenta, ao decorrer da fase proliferativa, se torna incompatível com a obtenção de O₂ e nutrientes, necessários para o crescimento celular. Em resposta à tais condições adversas, as alterações no metabolismo celular permitem a sobrevivência e a manutenção das altas taxas de proliferação (Costello e Franklim, 2012). Otto Warburg foi o primeiro pesquisador a observar que as células tumorais, mesmo em presença de O₂, utilizavam o metabolismo glicolítico com produção de altos níveis de lactato (o que mais tarde ficou conhecido como “Efeito Warburg”). Warburg associou este efeito à defeitos no metabolismo oxidativo (respiração celular) das células tumorais (Warburg, 1956); recentemente, diferentes pesquisas mostraram que a função mitocondrial destas células estava intacta e que a metabolização da glicose em lactato estava ligada à maior eficiência na produção de energia e outros blocos de construção (Koppenol, Bounds e Dang, 2011; Heiden e DeBerardinis, 2017).

Carboidratos e lipídeos são as principais fontes para a produção de energia metabólica (ATP) e a escolha da via metabólica será definida de acordo com as necessidades celulares, a disponibilidade de nutrientes e O₂ (Heiden e DeBerardinis, 2017). Assim, a capacidade de adaptação às condições adversas definirá a malignidade do tumor, induzindo alterações metabólicas e fisiológicas, como a evasão dos sinais de apoptose, insensibilidade aos sinais que impedem o crescimento celular, potencial de replicação ilimitado, capacidade de escapar do sistema imune e a produção de sinais que estimulam a proliferação celular e a angiogênese tecidual (**Figura 2**) (Weinberg e Hanahan, 2000; Giancotti, 2014).

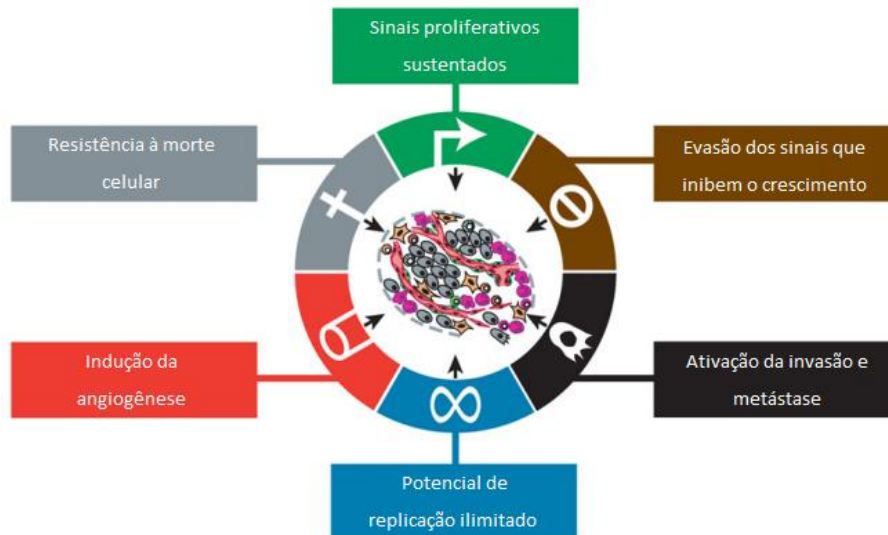


Figura 2. Principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral. Fonte: modificado de Hanahan e Weinberg (2011).

O descontrole da proliferação celular resultará no aumento da massa tumoral, com o aparecimento de áreas com hipóxia (baixo nível de O_2) que induzem a produção de diferentes citocinas que estimulam a angiogênese tumoral. A formação de novos vasos sanguíneos permitirá a distribuição de nutrientes, O_2 e a remoção de produtos de excreção; mais tarde, esses vasos vão permitir que as células tumorais tenham um acesso à circulação sanguínea para o desenvolvimento de metástases. A produção dos fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), atuam estimulando a proliferação de células endoteliais e guiando a formação dos novos vasos em direção ao tumor (Nagy, Dvorak e Dvorak, 2007; Trédan *et al.*, 2014).

Os processos de invasão e metástase são realizados apenas por tumores malignos e são considerados a principal causa para os altos níveis de morbidade relacionados às neoplasias. Para que as células tumorais adentrem a circulação sanguínea e/ou linfática é necessário passar por várias etapas (**Figura 3**). O desenvolvimento tumoral acontece, na maioria dos casos, ao longo de anos e são detectados apenas quando se encontram em estágios mais avançados (Melzer, von der Ohe e Hass, 2017). E ainda, mesmo após a transformação maligna, as células continuam

sendo expostas aos fatores carcinogênicos e sofrendo alterações em seu material genético, resultando em diferentes subclones, populações com características diferentes quanto à capacidade de proliferação, migração e resistência (Ramon y Cajal et al., 2014; Norum, Andersen e Sorlie, 2014).

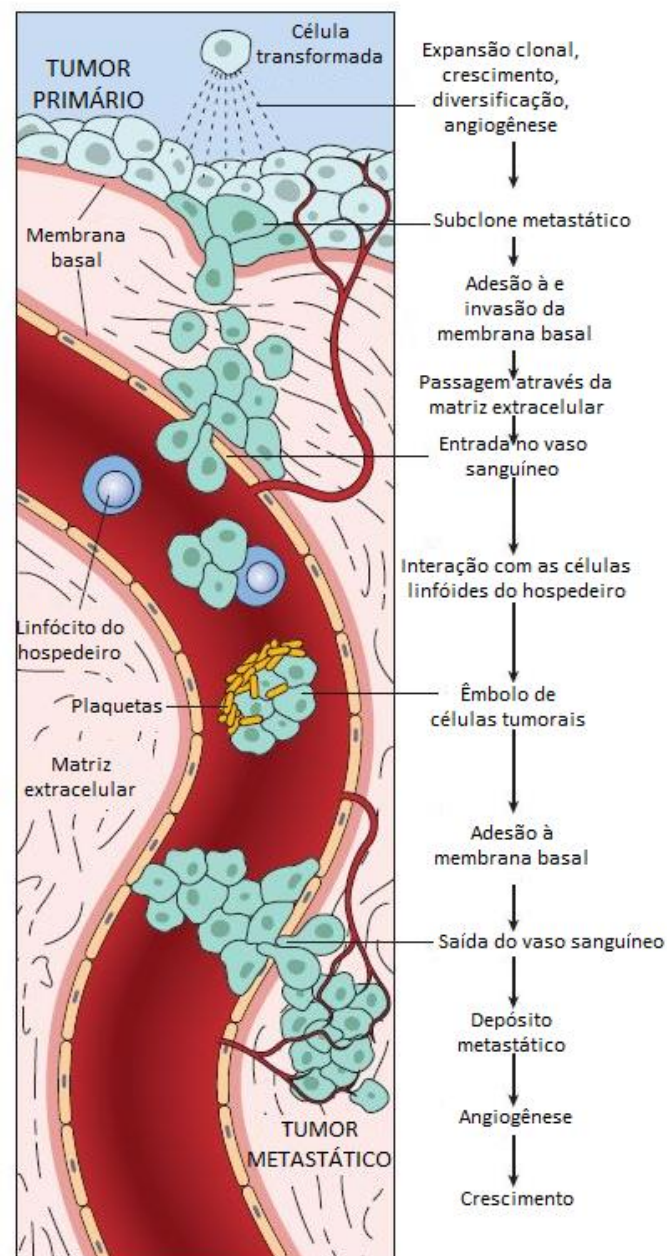


Figura 3. Etapas envolvidas na disseminação tumoral por via da circulação sanguínea.

Fonte: modificado de Kumar *et al.* (2010).

Entre as diferentes populações celulares presentes no tumor, algumas células passam a apresentar fenótipos (alterações morfológicas) e funcionalidades (redução de junções intercelulares e de moléculas responsáveis pela adesão celular) que reduzem a interação célula-célula, permitindo que estas se movimentem em direção aos tecidos adjacentes. O movimento das células neoplásicas pode ocorrer por dois processos: o ameboide, que é considerado o mais rápido, onde as células se apertam por entre os espaços presentes na matriz extracelular (MEC); e o mesenquimal, que depende da ação de uma grande quantidade de proteases, enzimas capazes de degradar a MEC (Friedl e Wolf, 2003; Guan, 2015; Melzer *et al.*, 2017).

A MEC funciona como uma barreira que separa os diferentes compartimentos teciduais e são importantes para a organização estrutural e funcional dos tecidos. Já as metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas responsáveis por promover respostas inflamatórias, a angiogênese e o remodelamento tecidual. As células tumorais e adjacentes produzem e secretam grandes quantidades de MMP, que atuam degradando a matriz extracelular, abrindo o caminho para a migração das células tumorais em direção à circulação sanguínea e/ou linfática (Bissel e Radisky, 2001; Melzer, von der Ohe e Hass, 2017).

Nesse processo, muitas células tumorais conseguem chegar até o interior dos vasos sanguíneos/linfáticos, porém encontram vários empecilhos que limitam o processo metastático e o estabelecimento do câncer em diferentes regiões. O ambiente vascular, a força mecânica exercida pelo fluxo sanguíneo e a colisão com outros componentes do sangue, bem como as ações antitumorais estimuladas pelo sistema imune e a falta de estímulo para promover a proliferação no novo sítio, são as causas da ineficiência e limitação do processo metastático (Maheswaran e Haber, 2010; Mitchell e King, 2013; Melzer, von der Ohe e Hass, 2017). Em um trabalho publicado por Meng e colaboradores (2004), células de câncer de mama, ao entrar na circulação, apresentavam uma sobrevivência de apenas algumas horas.

Apesar da baixa probabilidade de as células tumorais sobreviverem as intempéries do ambiente vascular e colonizar outros órgãos, algumas obtêm sucesso e conseguem concluir o processo de metástase. Já se sabe que alguns tumores, inclusive, apresentam preferências quanto ao local escolhido para a formação dos novos tumores

(Melzer, von der Ohe e Hass, 2017). Os tumores de mama, por exemplo, preferencialmente se disseminam para os pulmões, ossos, fígado e cérebro. Esse tropismo por órgãos específicos ainda não é completamente compreendido, mas pode ser explicado, por exemplo, pela expressão de receptores para algumas quimiocinas em células tumorais circulantes (Chambers, Groom e MacDonald, 2002; Minn *et al.*, 2005).

1.1.2 Fatores de risco

Como descrito anteriormente, as múltiplas exposições aos fatores carcinogênicos são necessárias para que a transformação maligna ocorra. A relação entre estes fatores e o aparecimento de neoplasias tem sido demonstrada por diferentes estudos epidemiológicos. As interações que ocorrem entre os fatores (genéticos ou ambientais) e o material genético resultarão em pequenas mutações, aumentando a probabilidade de desenvolver diferentes tipos de tumores (Steward e Wild, 2014).

A pré-disposição genética ao câncer está relacionada à história familiar, onde alterações em alguns genes importantes para o controle do funcionamento celular são herdados de nossos antepassados. Uma das relações mais bem estabelecidas para o desenvolvimento de câncer de mama são as mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, que aumenta em 10 vezes o risco de as mulheres desenvolverem o câncer (Mavaddat *et al.*, 2013; Ban e Godellas, 2014).

Outro gene mutado e que tem sido identificado em 50% dos tumores humanos é o TP53, que codifica a proteína *p53*, um importante fator de transcrição necessário para a regulação de várias vias de sinalização e que atua, principalmente, durante o estresse celular (Wei *et al.*, 2006; Vousden e Lane, 2007). Essas descobertas são responsáveis pelo aumento, nos últimos anos, do número de pessoas que buscam pelo aconselhamento genético, como uma forma de medida profilática, em países da Europa e Norte-Americanos (Narod, 2006).

Já os fatores ambientais estão associados principalmente ao estilo de vida do indivíduo, podendo ser causados por agentes biológicos, químicos e físicos (Steward e Wild, 2014). Diferentes agentes infecciosos também foram correlacionados à diversos

tipos de câncer. Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), apenas em 2012, cerca de 15% dos casos de câncer em todo o mundo foram atribuídos à alguma infecção. Entre os agentes infecciosos, podemos citar *Helicobacter pylori*, papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da hepatite C (HCV) (Plummer *et al.*, 2016).

Dentre os agentes químicos, o tabaco é considerado o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias, correspondendo a aproximadamente 22% das mortes relacionadas ao câncer (GBD Risk Factors Collaborators, 2016). Mas o consumo de álcool, a dieta, contato com poluentes ambientais e/ou ocupacionais, o uso de contraceptivos e o sedentarismo também são considerados importantes fatores de risco para uma variedade de cânceres. Outro agente é a radiação ultravioleta; considerada um agente físico, aumenta o risco para o desenvolvimento de cânceres de pele, um dos mais comuns em todo o mundo (Jemal *et al.*, 2014).

1.2 CÂNCER DE MAMA

Segundo informações da Organização Mundial da Saúde (2017), o câncer de mama é a principal neoplasia que acomete as mulheres em todo o mundo e é responsável pela quinta maior taxa de mortalidade entre os cânceres (**Figura 4**), estimando aproximadamente 571.000 mortes em 2015. Apesar de ser considerada uma doença relacionada à países desenvolvidos, 53% dos casos registrados em 2012 foram provenientes de países menos desenvolvidos (Ferlay et al., 2013). A detecção tardia do tumor, a falta de programas que visam o diagnóstico precoce da patologia, bem como a falta de equipamentos e medicamentos para o diagnóstico e tratamento, respectivamente, faz com que países menos desenvolvidos apresentem as maiores taxas de mortalidade (Coleman et al., 2008).

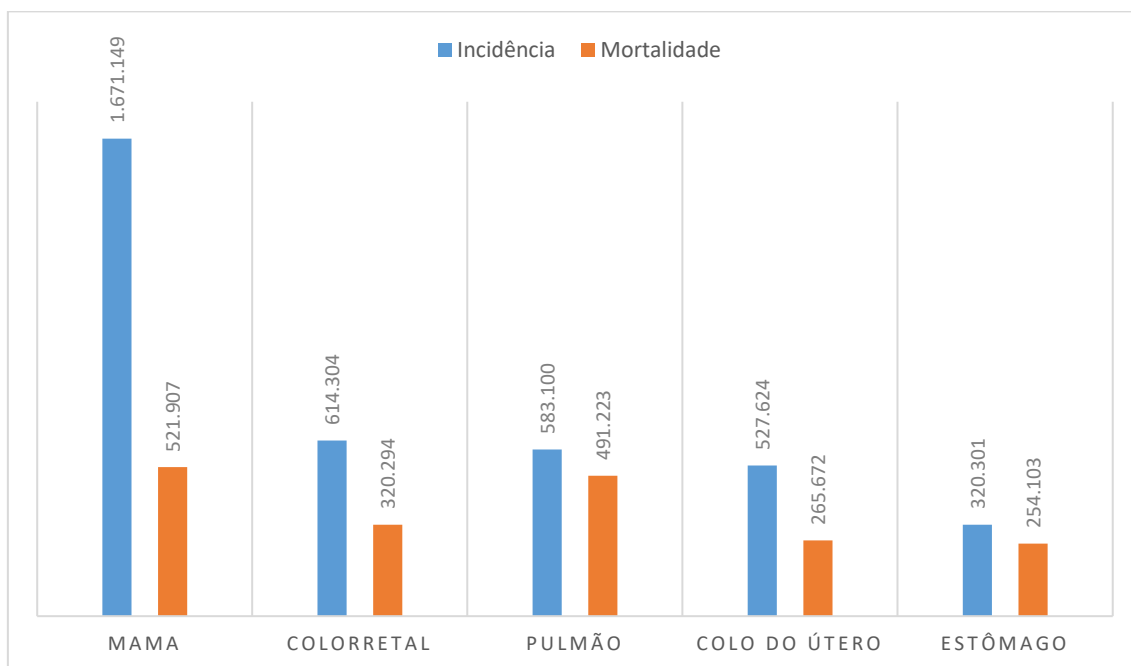



Figura 4. Número estimado para incidência e mortalidade para os 5 principais tipos de câncer que acometem mulheres, durante o ano de 2012 mundialmente. Fonte: Ferlay et al., 2013.

Apenas no Brasil, para o ano de 2016, foi estimado a notificação de quase 58 mil novos casos da doença (**Figura 5**). No levantamento mais recente, foram identificados 14.388 casos de mortes em 2013 (Sistema de Informação sobre Mortalidade, 2013). Apesar de também acometer homens, sua apresentação é rara e representa apenas 1% de todos os casos (Instituto Nacional do Câncer, 2015).

O consumo de álcool, a utilização de contraceptivos e de reposição hormonal (estrógeno e progesterona) e exposição a radiações ionizantes são alguns dos principais agentes carcinogênicos para o câncer de mama. Além disso, a idade, menarca precoce ou menopausa tardia, fatores reprodutivos (esterilidade, amamentação, episódios de aborto espontâneo) e história familiar prévia também são considerados fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia (Ban e Godellas, 2014; Dumalaon-Canaria *et al.*, 2014; Barnard, Boeke e Tamimi, 2016).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%		Homens Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 5. Dez tipos de câncer com maior incidência, em homens e mulheres, em 2016 no Brasil. Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2015.

1.2.1 Anatomia da Mama

As glândulas mamárias são órgãos presente apenas na classe dos mamíferos e que apresentam como principal função a produção, secreção e entrega do leite aos indivíduos recém-nascidos. O leite materno, além de fornecer uma nutrição completa para o desenvolvimento do bebê, também fornece proteção contra alergias, infecções

e algumas doenças do sistema imune (Medina, 1996). O desenvolvimento dessa glândula se inicia durante o desenvolvimento embrionário e ocorre ao longo de toda a vida, passando por diferentes fases. Entretanto, tais mudanças são mais acentuadas a partir da puberdade, quando a mama se modifica devido as alterações do ciclo hormonal feminino, e atinge a maturidade funcional apenas após a gravidez/lactação (Hassiotou e Geddes, 2012).

Na espécie humana, a mama está localizada à frente da parede torácica superior e são compostas basicamente pelos tecidos epitelial, subcutâneo e por um estroma especializado (**Figura 6**). Em sua organização, o tecido glandular é composto por unidades lobulares, responsáveis pela produção do leite, que será recolhido pelos ductos; estes vão se agrupando até a formação do seio lactífero, que se localiza próximo ao mamilo. Os ductos e lóbulos são formados por dois tipos celulares, (1) células mioepiteliais, que realizam contrações para a manutenção do fluxo de leite em direção ao ambiente externo, e as (2) células epiteliais luminais, que revestem as células mioepiteliais e, quando presentes na unidade lobular, são responsáveis pela produção do leite (Kumal *et al.*, 2010; Pandya e Moore, 2011; Hassiotou e Geddes, 2012).

Já o estroma é composto basicamente por tecido conjuntivo fibroso e tecido adiposo; exceto ao entorno dos lóbulos, que é composto por células que se assemelham aos fibroblastos. Estas células possuem a capacidade de responder as alterações hormonais do organismo. A comunicação estroma-epitélio é extremamente importante para a manutenção da função e estrutura dessa glândula (Wiseman e Werb, 2002).

Podemos dividir a mama em 4 quadrantes: superior e inferior, e estes em interno e externo. O maior quadrante é o superior externo, sendo também àquele em que a maioria dos tumores estão localizados. De qualquer forma, variações quanto ao tamanho, densidade e contorno são normais entre os indivíduos e devem ser levados em consideração durante a avaliação médica (Pandya e Moore, 2011).

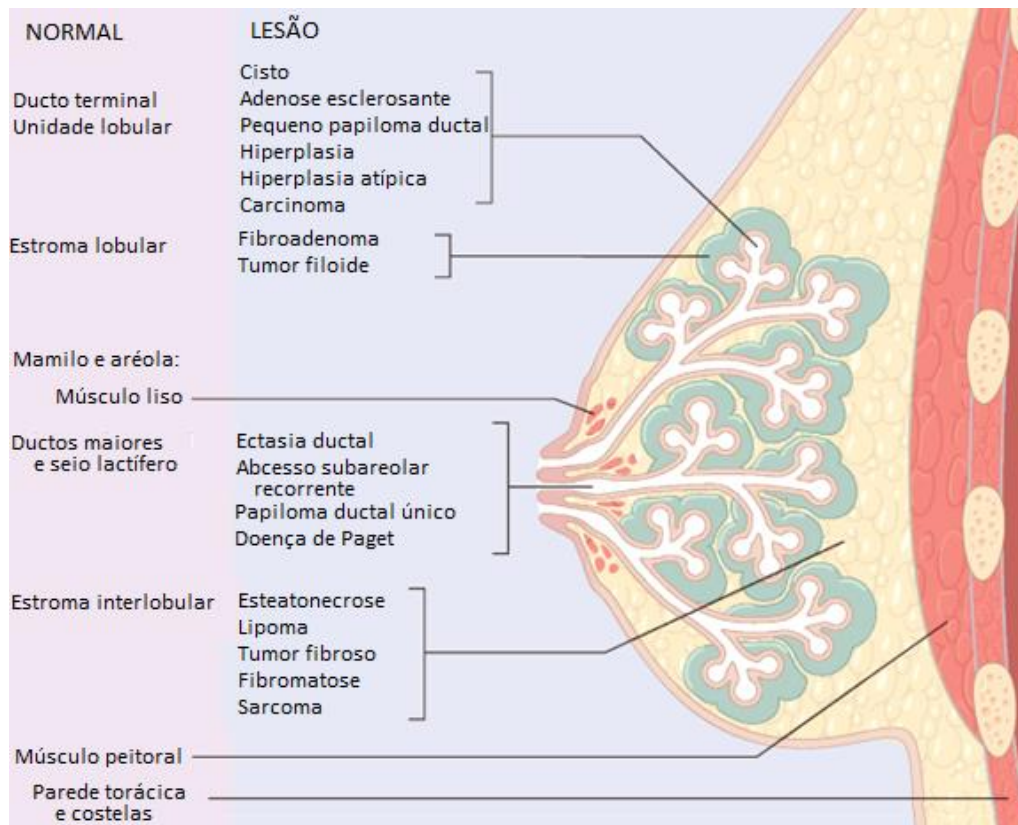


Figura 6. Esquema da estrutura anatômica da mama e origem das principais lesões.

Fonte: modificado de Kumal *et al.*, 2010.

1.2.2 Diagnóstico

A detecção precoce de alterações na mama é responsável por uma considerável redução no número de mortes causadas pelo câncer de mama. Atualmente, existem diferentes métodos diagnósticos, mas a mamografia é o mais utilizado em todo o mundo (Stewart e Wild, 2014). No Brasil, desde 2015, é preconizado que seja feita a realização de uma mamografia a cada dois anos para as mulheres entre 50 e 69 anos, além da realização do autoexame periodicamente (Instituto Nacional do Câncer, 2017).

Apesar de ser extremamente utilizado e de apresentar uma alta sensibilidade, este método apresenta falhas no diagnóstico e pode ocultar a presença de alguns tipos de tumores. Fatores como uma maior densidade do tecido mamário, o posicionamento do seio para a realização do método, pouca ou excesso compressão durante o exame, e a qualidade da imagem obtida são responsáveis pela maioria dos resultados inespecíficos (Giess, Frost e Birdwell, 2012).

Outras metodologias foram surgindo com o passar do tempo e têm sido utilizadas, em conjunto com a mamografia, para um diagnóstico mais preciso. Entre estas técnicas podemos citar a ultrassonografia da mama que, em um estudo clínico, aumentou a acurácia da detecção dos tumores localizados em mamas mais densas (Berg *et al.*, 2008). A ressonância magnética também apareceu como método diagnóstico, mostrando uma maior sensibilidade que a mamografia, podendo estar associada ou não à ultrassonografia. Devido ao alto número de resultados falso-positivos, esta técnica é considerada ideal apenas para os grupos que apresentam um risco elevado para o desenvolvimento da neoplasia (Saslow *et al.*, 2007; Giess, Frost e Birdwell, 2012).

O diagnóstico por imagem fornece ao médico oncologista informações quanto a presença ou não de uma massa tecidual proliferativa e a morfologia da mesma, sendo quase sempre suficiente para diferenciar tumores benignos e malignos. Entretanto, o exame patológico é de extrema importância e imprescindível para a identificação de características e padrões moleculares, que auxiliam na escolha do tratamento e fornecem informações quanto ao prognóstico (Kumal *et al.*, 2010).

1.2.3 Classificação do carcinoma mamário

O carcinoma da mama é considerado uma doença bastante heterogênea, apresentando tumores com características bem variáveis entre as mulheres. Normalmente, os tumores são classificados em subtipos de acordo com sua morfologia, tamanho, acometimento de nódulos, expressão de alguns marcadores moleculares, entre outros parâmetros. A separação dos tumores em subtipos é utilizada pela clínica como uma ferramenta para prever o desenvolvimento da patologia, definir um prognóstico e ainda auxiliar na escolha do tipo de tratamento (Dai *et al.*, 2016).

Entre os distúrbios benignos que podem acometer a mama (**Figura 7**), nós temos três que normalmente apresentam maiores riscos para o desenvolvimento de um câncer mamário: (1) as alterações mamárias não proliferativas, (2) a doença mamária proliferativa e (3) a hiperplasia atípica (Santen e Mansel, 2005). As alterações não proliferativas, ou alterações fibrocísticas, são muito comuns entre as mulheres e não apresentam grandes riscos para o desenvolvimento de tumores. Já a doença

proliferativa é encontrada, na maioria dos casos, associada com alterações não proliferativas; apesar do aumento no número de células do epitélio e/ou do estroma, as características celulares e a arquitetura do tecido não se encontram muito alteradas. A hiperplasia atípica, por outro lado, apresenta grande semelhança com o carcinoma *in situ*, devido a presença de alterações genéticas que são normalmente encontradas neste tipo de neoplasia (Guray e Sahin, 2006; Kumal *et al.*, 2010).

As neoplasias que acometem a mama podem ser divididas em 2 grandes grupos (**Figura 7**), sendo o primeiro composto pelos chamados carcinomas *in situ* (Vuong *et al.*, 2014). O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) era uma patologia não muito comum, mas que a introdução das políticas de prevenção com o uso da mamografia permitiu uma melhor identificação, demonstrando que sua incidência era consideravelmente maior. É caracterizada pela multiplicação exacerbada das células epiteliais dos ductos, mas sem a perda da integridade da membrana basal (Duggal, Robin e Julian, 2013). Já o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) é caracterizado por alterações nas células dos lóbulos mamários, com perda na capacidade de adesão celular (King e Reis-Filho, 2014).

Os carcinomas invasivos (ou infiltrantes) constituem o segundo grupo de tumores que podem acometer a mama, identificados pela invasão de tecidos adjacentes e uma grande tendência de formar metástases. Podem ainda ser subdivididos em mais de 21 tipos de acordo com o seu tipo histológico, sendo o “carcinoma invasivo sem nenhum tipo específico” o mais comum (40 a 75% dos casos) (Vuong *et al.*, 2014). Além disso, todos os tumores invasivos são avaliados e classificados com bases em seu grau histológico, expressão dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), além do perfil de expressão gênica (Allison, 2012).

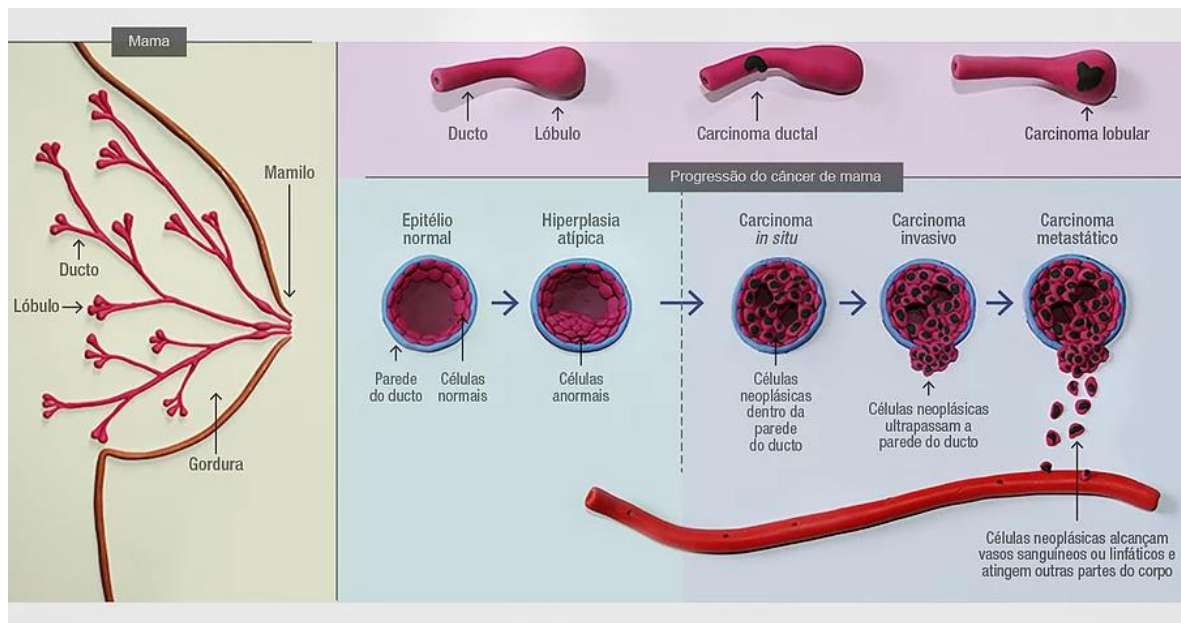


Figura 7. Alterações proliferativas podem progredir para quadros de carcinomas mamários com diferentes níveis de invasão. Fonte: Centro Integrado de Oncologia, 2015.

1.2.4 Linhagens Celulares

Utilizada pelos mais diversos campos de pesquisa, principalmente em modelos *in vitro*, as linhagens celulares se tornaram importantes ferramentas para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares e a avaliação de novos compostos terapêuticos (Niu e Wang, 2015). A facilidade de manuseio e manutenção, o alto nível de homogeneidade entre as células, a capacidade ilimitada de auto-replicação e reservatórios celulares sob congelamento, são algumas das vantagens ao uso de células de linhagem (Burdall *et al.*, 2003).

Entretanto, já foi demonstrado que células, quando em cultura por muito tempo, podem sofrer alterações geno/fenotípicas e levar a proliferação de subpopulações, como também serem contaminadas por outras linhagens celulares (Osborne, Hobbs e Trent, 1987). De forma geral, sua utilização é encorajada pelas facilidades da técnica, mas cuidados são necessários para que as limitações não interfiram nos resultados.

George Gey foi o responsável por estabelecer a primeira linhagem celular: *Hela*, uma linhagem derivada de um carcinoma cervical (Gey, Coffman e Kubicek, 1952). Anos

depois, a primeira linhagem celular proveniente de um tumor da mama foi estabelecida (Lasfargues e Ozzello, 1958), mas somente após o estabelecimento da linhagem MCF-7 que essa técnica passou a ser extremamente utilizada. A presença dos receptores de estrogênio neste tipo celular o torna ideal para os estudos dos tumores hormônio-dependentes (Lee, Oesterreich e Davidson, 2015).

Outras linhagens foram desenvolvidas e apesar da variedade de linhagens celulares disponíveis para o estudo dos carcinomas da mama, a maioria dessas linhagens são provenientes de tumores metastáticos. Este cenário não representa a grande diversidade tumoral que é encontrada clinicamente, além de não retratar os diferentes estágios da progressão tumoral. A utilização de cultivos celulares provenientes de carcinomas primários seria de maior relevância clínica, uma vez que a maior parte dos fármacos atuam durante esta fase da tumorigênese (Burdall *et al.*, 2003).

1.2.5 Tratamentos

A escolha de qual tratamento será utilizado no combate ao carcinoma de mama está normalmente associado ao grau de acometimento dos linfonodos, de invasão dos tecidos adjacentes e à presença de focos de metástase. Normalmente, CLIS não necessita de tratamentos locais ou sistêmicos, mas as mulheres que apresentam esta alteração necessitam de um monitoramento mais rigoroso. Já nos casos de CDIS, a remoção parcial da mama em conjunto com a radioterapia é considerada o protocolo mais utilizado, devido a possibilidade de progressão para o carcinoma invasivo (Maughan, Lutterbie e Ham, 2010).

A mastectomia (remoção total da mama), a quimioterapia e a radioterapia são os procedimentos mais comuns no tratamento dos tumores da mama, podendo ser utilizados de maneira isolada ou em associação com outros protocolos. A radioterapia (utilização de radiação para gerar danos ao DNA celular e induzir a morte celular) e, principalmente, a quimioterapia (utilização de fármacos que causam diferentes alterações celulares que levam a morte celular) não são tratamentos específicos para as células tumorais e, por isso, podem causar vários efeitos colaterais nos pacientes (Majeed *et al.*, 2014).

Apesar do uso amplo destes tratamentos, nem todos os tumores respondem (de maneira satisfatória) a estes tipos de tratamento. Por isso, a busca por novas formas de tratamento e novos alvos farmacológicos têm sido cada vez maior nos últimos anos. O desenvolvimento de terapias hormonais, de anticorpos monoclonais, de imunoterapias, a utilização de produtos naturais e de modificações na dieta são exemplos de novos tratamentos que vêm sendo utilizados na tentativa de melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes em tratamento (Maughan, Lutterbie e Ham, 2010; Majeed *et al.*, 2014; Diaby *et al.*, 2015).

Recentemente, o número de estudos que avaliam a participação dos canais iônicos na biologia do câncer cresceu consideravelmente e têm apontado estas estruturas como importantes alvos terapêuticos. Fármacos que atuam como bloqueadores de canais, mas que são utilizados no tratamento de outras patologias, estão sendo testados no tratamento de diversos tipos de tumores (Ancangeli e Becchetti, 2015; Kale, Amin e Pandey, 2015).

1.3 CANAIS IÔNICOS

Estruturas importantes para o controle da permeabilidade celular, os canais iônicos são alvos de diversos fármacos no tratamento de diversas doenças. Nos últimos anos, ganharam grande importância na busca por novas formas de diagnóstico e tratamento de neoplasias (Ancangeli e Becchetti, 2015). Essa família de diferentes proteínas integrais de membrana, além de funcionarem como portões que controlam a passagem de íons específicos pela membrana, são capazes de responder a diferentes estímulos físicos e químicos do ambiente celular, desencadeando diferentes vias de sinalização (Hille, 2001).

Normalmente associados à bioeletrogênese, os canais iônicos dependentes de voltagem estão presentes em células excitáveis e são estimulados pela alteração do potencial de membrana. Entretanto, a presença dessas proteínas e a sua participação em várias funções celulares já foi amplamente descrita pela literatura (Litan e Langhans, 2015; Rao *et al.*, 2015). A análise da estrutura desses canais demonstrou de forma clara quais as regiões importantes para a determinação da seletividade iônica, que é uma propriedade importante para essa classe de proteínas. Por isso, os canais dependentes de voltagem foram classificados de acordo com o íon ao qual possuem maior permeabilidade: canais de Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e H^+ (Hille, 2001).

1.3.1 Canais de Na^+ dependentes de voltagem

Os primeiros estudos que identificaram e mostraram a participação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem (VGSC) na bioeletrogênese foram feitos por Hodgkin e Huxley. Nestes estudos, os autores mostraram que a ativação destes canais era dependente da despolarização no potencial de membrana ($> -55 \text{ mV}$), que esse sistema era seletivo para os íons Na^+ e que a inativação destes canais era feita de forma rápida (1-2 ms). Além disso, evidências apontavam para a participação desses canais na fase de despolarização do potencial de ação do axônio gigante de lula (Hodgkin e Huxley, 1952).

Em seguida, vários estudos foram conduzidos e trouxeram um conhecimento básico sobre os mecanismos moleculares que controlam o *gating* desses canais iônicos. Com o avanço da cristalografia foi possível determinar a estrutura tridimensional dessa classe de proteínas de membrana, o que propiciou um enorme salto no entendimento, agora em nível atômico, do comportamento cinético dos diversos tipos de canais iônicos (Morais Cabral *et al.*, 1998; Catterall e Swanson, 2015).

Os VGSC são formados por uma subunidade denominada alfa (α) e uma ou mais subunidades beta (β). Com aproximadamente 260 kDa, a subunidade α é responsável pela formação de todo o poro e é composta por 4 domínios homólogos (I-IV), onde cada um destes domínios apresentam 6 segmentos transmembrana (S1-S6) (**Figura 8**). Os segmentos S1 a S4 de cada domínio são responsáveis por compor o módulo de sensoriamento de voltagem, com a presença de resíduos de aminoácidos carregados positivamente que, em resposta a alterações no potencial de membrana, desencadeiam alterações conformacionais e a posterior abertura do poro; já este é formado pelas alças presentes entre os segmentos S5 e S6 (Catterall, 2012; Kruger e Isom, 2016).

Já as subunidades β (33 – 39 kDa) são compostas tipicamente por um único domínio transmembrana, um grande domínio extracelular do tipo imunoglobulina (Ig) (na extremidade N-terminal) e um domínio intracelular menor (na extremidade C-terminal). Por muitos anos foram consideradas estruturas meramente auxiliares, não sendo, portanto, essenciais para o funcionamento do canal iônico. No entanto, estudos mais recentes fornecem evidências de que essas subunidades interagem com diferentes estruturas através do seu domínio Ig, modulando algumas funções de *gating*, tráfego, localização e adesão (O'Malley e Isom, 2016; Bouza e Isom, 2017).

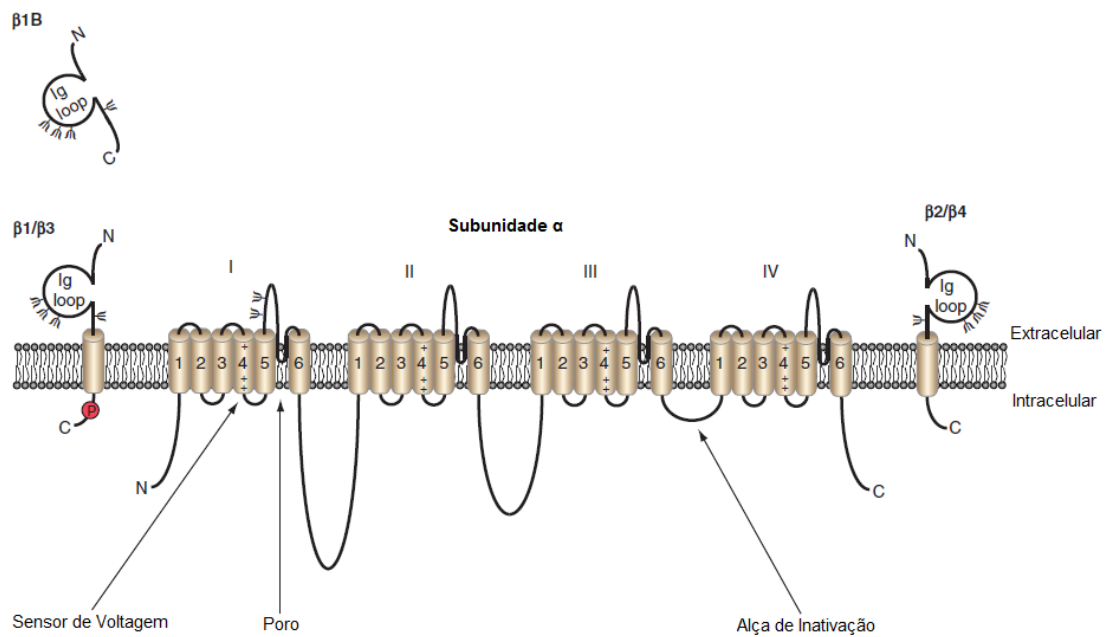


Figura 8. Representação topológica dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem: subunidades α e β . I, II, III e IV correspondem aos domínios homólogos presentes na subunidade α . Fonte: modificado de Brackenbury e Isom, 2011.

Dez genes são responsáveis por codificar 9 isoformas da subunidade α dos canais de sódio dependentes de voltagem, Nav1.1 a Nav1.9. Cada um desses genes apresenta um tipo tecidual de maior expressão, apesar de estarem presentes, também, em outros tipos teciduais (**Tabela 1**). Já as subunidades β apresentam uma menor diversidade, com apenas 5 isoformas identificadas, $\beta1$ a $\beta4$ e $\beta1B$ (variante do *splicing* de $\beta1$ e que é encontrada fora da membrana). Ao contrário das subunidades α , a expressão destas apresenta uma certa promiscuidade e, até o momento, não foi identificado nenhum padrão de associação entre ambas as isoformas (Kruger e Isom, 2016).

<i>Tipo</i>	<i>Gene</i>	<i>Distribuição tecidual</i>	<i>TTX-sensibilidade</i>
Nav 1.1	SCN1A	SNC, SNP, Coração	+++
Nav 1.2	SCN2A	SNC, SNP	+++
Nav 1.3	SCN3A	SNC, SNP, Coração	+++
Nav 1.4	SCN4A	Músculo esquelético, Coração	+++
Nav 1.5	SCN5A	Músculo esquelético, Coração, SNC	+
Nav 1.6	SCN8A	SNC, SNP, Coração	+++
Nav 1.7	SCN9A	SNP	+++
Nav 1.8	SCN10A	SNP	++
Nav 1.9	SCN11A	SNP	+
β1	SCN1B	SNC, SNP, Coração, Glia	N/A
β2	SCN2B	SNC, SNP, Coração	N/A
β3	SCN3B	SNC, SNP, Coração	N/A
β4	SCN4B	SNC, SNP, Coração	N/A
β1B	SCN1B	SNC fetal, SNP, Coração	N/A

Tabela 1. Genes, padrão de expressão tecidual e sensibilidade à tetrodotoxina (TTX) para os canais de Na⁺ dependentes de voltagem. SNC, Sistema nervoso central; SNP, Sistema Nervoso Periférico; N/A, Não se aplica. Fonte: Kruger e Isom, 2016.

Para o funcionamento dos VGSC, as etapas de ativação e inativação devem funcionar de maneira acoplada. Devido a diferença eletroquímica existente entre os ambientes intra e extracelular, a face interna da membrana citoplasmática se torna carregada negativamente. Esta carga negativa interage com resíduos de aminoácidos presentes no segmento S4, mantendo o canal em um estado conformacional fechado. Com a despolarização da membrana, normalmente entre -70 a -50 mV, essas ligações se tornam mais fracas, permitindo a rotação de S4 e, conseqüentemente, a abertura do poro. A inativação destes canais acontece após alguns milissegundos e envolve uma alça intracelular entre os domínios III e IV, que se liga a extremidade interna do canal e bloqueia a passagem de íons através do poro (Armstrong, 1981; Catterall, 2000).

Uma grande gama de drogas e toxinas apresentam como sítio primário de ligação os VGSC; com a capacidade de bloquear o trânsito de íons através desses canais, muitas dessas substâncias têm sido utilizadas no combate a várias doenças (Catterall, 2012; Kwong e Carr, 2015; Kruger e Isom, 2016). Entre os bloqueadores dos VGSC podemos citar a lidocaína, verapamil, fenitoína, ranolazine e a tetrodotoxina (TTX) (Catterall, Goldin e Waxman, 2005; Litan e Langhans, 2015; Kwong e Carr, 2015).

Esta última é uma potente toxina encontrada em alguns peixes e anfíbios, se ligando aos VGSC e inibindo a geração e condução do potencial de ação de músculos e nervos. Após o aparecimento de vários óbitos no Japão devido ao consumo de peixes fugu (baiacu), o Dr. Yoshizumi Tahara conseguiu isolar e identificar, em 1909, a presença de uma substância neurotóxica presente nas gônadas do baiacu (como revisto por Bane *et al.*, 2014; Lago *et al.*, 2015).

Observou-se que os VGSC apresentavam diferenças quanto a sensibilidade à TTX. Essa propriedade farmacológica dos canais de Na⁺ resultou em uma grande utilização dessa toxina em estudos biofísicos, uma vez que as isoformas podem ser consideradas sensíveis ou resistentes à TTX (inibição é visualizada após a administração de 100nM e 10µM, respectivamente) (Hille, 2001; Roger *et al.*, 2015). Entretanto, não pode ser aplicada clinicamente, uma vez que a administração de baixas doses é letal (Bane *et al.*, 2014; Lago *et al.*, 2015).

Devido a sua grande importância na excitabilidade celular, alterações nos VGSC estão normalmente associadas a patologias cardíacas e neurológicas. Por exemplo, mutações nos canais Nav1.5 levam ao desenvolvimento das síndromes do QT longo e de Brugada; já o acometimento de Nav1.7 pode causar desordens sensoriais relacionadas à percepção da dor (Catterall, 2012; Kwong e Carr, 2015; Kruger e Isom, 2016). Mas nos últimos anos, estudos têm evidenciado a presença e a participação desses canais em funções consideradas não-canônicas; entre estes estudos, vamos dar destaque aos que relacionam os VGSC ao desenvolvimento de neoplasias da mama (Onkal e Djamgoz, 2009; Kim, 2015; Litan e Langhans, 2015; Kruger e Isom, 2016).

1.3.2 Canais de Na⁺ dependentes de voltagem e o câncer de mama

As primeiras evidências sobre a presença de VGSC em células não-excitáveis aconteceu durante os anos 80, com a realização de experimentos eletrofisiológicos em astrócitos e em células de Schwann. Após estes estudos, houve um aumento no número de trabalhos que apresentavam a descrição de canais de Na⁺ em diferentes tecidos e a sua participação em outras funções celulares não-ligadas a excitabilidade (Black e Waxman, 2013).

Por serem estruturas que permitem o fluxo de íons através da membrana celular, os canais iônicos auxiliam no controle da homeostase e do volume celular. Além disso, alterações na expressão dessas proteínas têm se mostrado relevantes na regulação de diferentes processos biológicos importantes para o desenvolvimento tumoral, como a proliferação, adesão, invasão, motilidade e resistência à apoptose (Schwab e Stock, 2014; Roger et al., 2015). Os trabalhos de Yamashita *et al* (1987), Lee *et al* (1988) e Pancrazio e colaboradores (1989) foram os primeiros que mostraram a presença de VGSC em células tumorais (leucemia e câncer de pulmão, respectivamente); posteriormente, a presença destes canais em tumores de mama, próstata, colo do útero e ovário também foram descritas (**Tabela 2**) (Brackenbury, 2012; Arcangeli e Becchetti, 2015; Roger et al., 2015).

<i>Tipo</i>	<i>Neoplasia</i>
Nav 1.1	Ovário
Nav 1.2	Colo do útero, Mesotelioma, Ovário, Próstata
Nav 1.3	Ovário, Próstata, Pulmão (PC)
Nav 1.4	Colo do útero, Ovário, Próstata
Nav 1.5	Mama, Colorretal, Linfoma, Neuroblastoma, Ovário, Pulmão (CNP e PC)
Nav 1.6	Mama, Colo do útero, Linfoma, Melanoma, Mesotelioma, Pulmão (CNP e PC), Próstata
Nav 1.7	Mama, Colo do útero, Linfoma, Mesotelioma, Pulmão (CNP), Ovário, Próstata
Nav 1.8	-
Nav 1.9	Linfoma, Pulmão (PC)
β1	Mama, Colo do útero, Pulmão (CNP), Próstata
β2	Mama, Colo do útero, Pulmão (CNP), Próstata
β3	Colo do útero, Pulmão (CNP), Próstata
β4	Mama, Colo do útero, Pulmão (CNP), Próstata

Tabela 2. Distribuição dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem entre os tipos de câncer já relatados pela literatura. PC, Pequenas células; CNP, Células não-pequenas. Fonte: Brackenbury, 2012.

Estudos realizados com diferentes linhagens celulares provenientes de tecido normal e neoplásico de mama mostraram que, em condições fisiológicas, as células da mama parecem não expressar nenhuma isoforma dos VGSC. Entretanto, com o desenvolvimento tumoral e o aumento da agressividade, as células apresentam uma alteração no padrão de expressão e funcionamento dessas proteínas de membrana (Roger et al., 2006; Brackenbury, 2012).

Fraser e colaboradores (2005) utilizaram medidas eletrofisiológicas para mostrar que células de mama normais (MCF-10A) não apresentavam correntes de entrada (representando a passagem de íons para o ambiente intracelular). Os mesmos achados foram observados para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-468, que correspondem a células tumorais metastáticas com baixo poder invasivo. Entretanto, a análise dos registros obtidos para as células MDA-MB-231 (células de tumor metastático da mama com alto

poder invasivo) mostraram a presença de uma corrente de influxo atribuída à abertura de canais de Na^+ (**Figura 9**).

Outra importante informação apresentada neste trabalho é que apesar da linhagem MCF-7 não apresentar indícios sobre a presença de VGSC, as células produziam RNA mensageiro para as isoformas Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 (Fraser *et al.*, 2005). Todos estes achados estão de acordo com outros trabalhos publicados e apontam para a participação destes canais em processos que auxiliam o aumento da agressividade tumoral (Grimes *et al.*, 1995; Roger, Besson e Le Guennec, 2003; Judé *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2009; Brisson *et al.*, 2011).

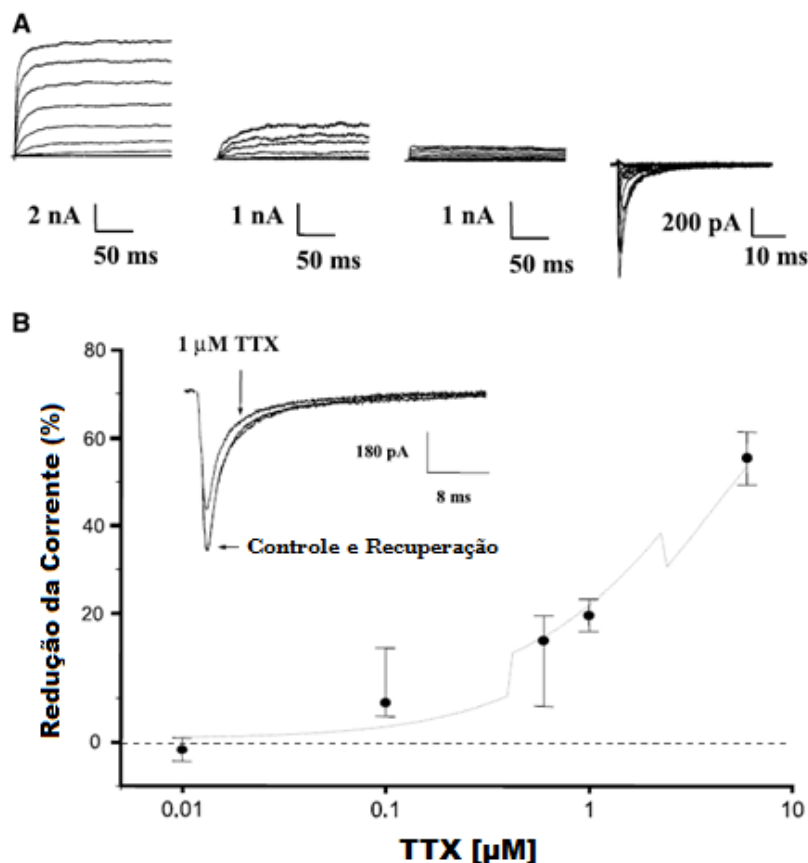


Figura 9. Registros eletrofisiológicos de células normais e tumorais provenientes de tecido mamário. (A) Correntes ativadas após a despolarização do potencial de membrana em MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-468 e MDA-MB-231 (da esquerda para a direita). Correntes de efluxo compatíveis com a ativação de canais de K^+ . (B) Curva de concentração-resposta para o efeito da TTX nas correntes de influxo em células MDA-MB-231. Fonte: Fraser *et al.*, 2005.

Através das propriedades farmacológicas dos VGSC e da utilização de metodologias que permitem a identificação e quantificação de proteínas, a expressão predominante da isoforma Nav1.5 em células tumorais de carcinomas mamários (linhagem celular e biopsia) foi observada, bem como a presença predominante desse canal em sua isoforma neonatal (nNav1.5) (Diss, 2001; Fraser et al., 2005; Chioni et al., 2005; Brackenbury et al., 2007). Normalmente encontrada durante a fase neonatal e pouco dias após o parto, a isoforma neonatal é considerada uma variante de *splicing* da isoforma adulta. A troca de trinta e um nucleotídeos na sequência codificadora desse canal resulta na modificação de sete aminoácidos, localizados em S1 do domínio I e na alça de ligação entre os domínios III e IV (**Figura 10**) (Onkal et al., 2008; Onkal e Djamgoz, 2009; Brackenbury, 2012).

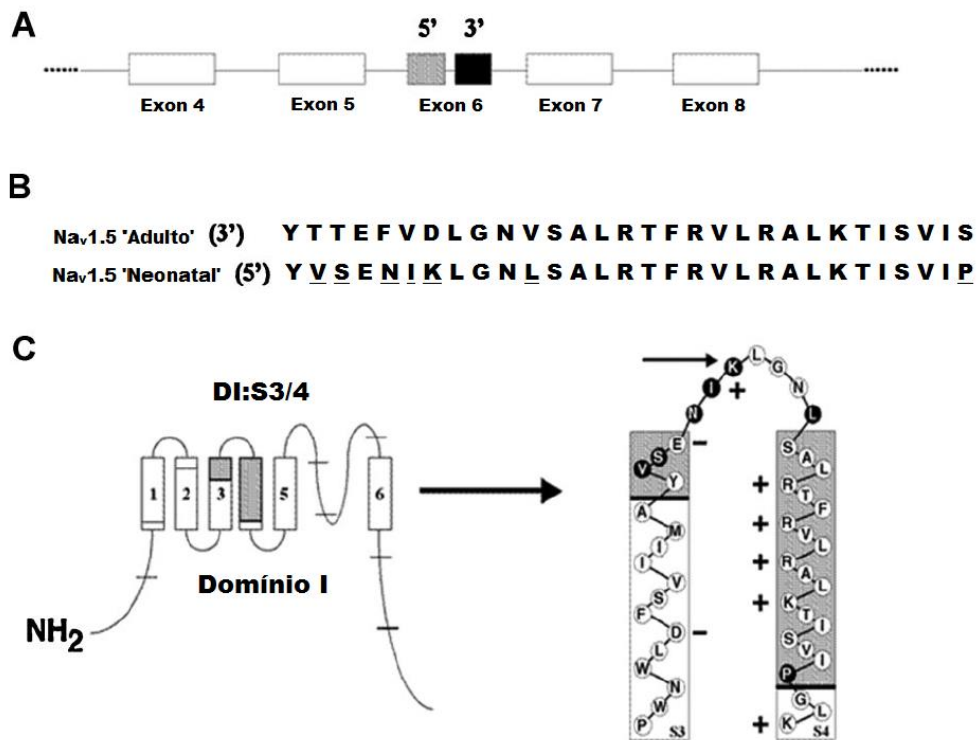


Figura 10. Diferenças moleculares entre as isoformas adulta e neonatal de Nav1.5. (A) Representação esquemática da sequência codificante do gene SCN5A, mostrando as posições no *exon 6* para os possíveis *splicings* (5' adulto e 3' neonatal). (B) Sequência de aminoácidos para cada isoforma, com os aminoácidos alterados indicados (sublinhado). (C) Localização das regiões alteradas pelo *splicing* e posicionamento dos aminoácidos alterados (preto) na formação do poro. A seta pequena indica a troca de carga devido alteração do aminoácido. Fonte: modificado de Onkal *et al.*, 2008.

A expressão de VGSC apenas em célula neoplásica altamente metastática despertou um grande interesse pela utilização dessas proteínas como possíveis alvos farmacológicos no combate ao câncer de mama. A existência de uma grande disponibilidade de fármacos já aprovados para o uso em humanos e que atuam nos VGSC, mas sem apresentar efeitos colaterais tão fortes quanto os quimioterápicos atuais, são informações relevantes na escolha de possíveis alvos farmacológicos (Onkal e Djamgoz, 2009; Brackenbury, 2012).

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* mostraram que a inibição dos VGSC por diversos tipos de bloqueadores induz uma redução de vários processos celulares; já o aumento da sua atividade mostrou induzir estas atividades (Fraser *et al.*, 2005; Brackenbury *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2015; Roger *et al.*, 2015). Driffort e colaboradores (2014) demonstraram que a administração de 50 μ M de ranolazine, um bloqueador da INa^+ tardia, reduziu a capacidade de invasão e de degradação da matriz extracelular em células MDA-MB-231; já nos testes *in vivo*, a administração diária do bloqueador mostrou reduzir as áreas de metástase no pulmão.

O uso do antiepiléptico fenitoína também mostrou reduzir a migração e invasão de células tumorais *in vitro* e *in vivo* (Yang *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2015). Apesar de vários estudos, ainda se sabe muito pouco sobre os mecanismos que participam do aumento da agressividade tumoral controlada pelos VGSC. Foi demonstrado que os canais Nav1.5, expressos em células MDA-MB-231, são capazes de modular a expressão do trocador NHE-1, mantendo um ambiente mais acidificado no meio extracelular, ideal para a ação de catepsinas e uma consequente remodelação da matriz extracelular. Além disso, a interação entre o trocador e o canal promovia um aumento na capacidade de migração celular (Gillet *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012; Brisson *et al.*, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma patologia de grande importância epidemiológica em todo o mundo, sendo apontado como o principal entre as mulheres devido aos altos índices de incidência e mortalidade. Entretanto, e apesar dos avanços obtidos até o momento, ainda não se tem a cura ou um tipo de tratamento que apresente poucos efeitos colaterais, tornando necessária a busca constante por novos alvos terapêuticos. Nesse sentido, os canais iônicos têm sido investigados e são apontados como novos alvos para o desenvolvimento de terapias mais efetivas. Descobertas recentes vêm mostrando que diferentes canais iônicos estão envolvidos no processo de desenvolvimento tumoral e progressão da patologia (Hannahan e Weinberg, 2011; Brackenbury, 2012; Roger et al., 2015; Kruger e Isom, 2016). Os canais de Na⁺ dependentes de voltagem, em específico, têm sido associados ao aumento da agressividade tumoral e ao desenvolvimento de metástases (Schwab e Stock, 2014; Roger et al., 2015). Diferentes estudos apontam para o aparecimento e o aumento da expressão destes canais, mais especificamente dos canais do tipo Nav1.5, mostrando uma correlação com o aumento dos processos de migração, invasão, galvanotaxis e perda da adesão celular (Roger, Besson e Le Guennec, 2005; Fraser *et al.*, 2005; Brackenbury *et al.*, 2007; Gillet *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012; Brisson *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2015; Nelson *et al.*, 2015). Estes estudos afirmam sobre a participação dos VGSC no aumento da agressividade tumoral; entretanto, as análises conduzidas até o momento utilizaram apenas linhagens celulares oriundas de tumores metastáticos, não considerando os estágios mais iniciais da doença e, conseqüentemente, não reproduzindo o seu desenvolvimento. Será que estes canais iônicos não estão presentes em tumores primários? Será que estes canais também não participam de processos celulares importantes para o estabelecimento do tumor? Baseado no exposto, o presente trabalho buscou avaliar a presença e funcionamento dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem, bem como a identificação da isoforma predominante, em células provenientes de dois tumores de mama em estágios iniciais, classificados como primários.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a presença e o funcionamento dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem do tipo Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 nas linhagens celulares MACL-1 e MGSO-3, provenientes de um tumor primário de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar as correntes iônicas macroscópicas relacionadas aos canais de Na⁺ dependentes de voltagem nas linhagens celulares MACL-1 e MGSO-3.
- Identificar os canais de Na⁺ dependentes de voltagem de acordo com suas características farmacológicas.
- Quantificar o nível de expressão proteica de Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 nas linhagens celulares MACL-1 e MGSO-3.
- Localizar as isoformas Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 dentro do ambiente celular nas linhagens celulares MACL-1 e MGSO-3.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA CELULAR

Foram utilizadas quatro linhagens celulares: MCF-10A (tecido normal da mama), MACL-1 e MGSO-3 (ambas correspondem a tumores primários da mama), e MDA-MB-231 (tumor metastático da mama). As linhagens MACL-1 e MGSO-3 (Corrêa *et al.*, 2013) foram gentilmente cedidas pelo Professor Alfredo Miranda Góes (Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil), enquanto as demais foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC).

As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose, D1152; Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (F2561; Sigma-Aldrich, EUA) e 1% de solução antibiótica (10.000 unidades de penicilina e 10mg/mL de estreptomicina) (P4333, Sigma-Aldrich, EUA), em frascos de cultura celular de 25 e 75 cm² (Sarstedt, Alemanha), em uma estufa úmida contendo 5% de CO₂ à 37°C (Thermo Fisher Scientific, EUA). O meio de cultura era trocado a cada 2 dias ou 3 dias; ao atingir a confluência de repique (entre 70 a 90%), as células eram tripsinizadas (Trypsin-EDTA, T4049; Sigma-Aldrich, EUA) e resuspendidas em um novo meio de cultura completo para a utilização nos experimentos ou para o crescimento em novas garrafas. Os estoques celulares foram mantidos sob congelamento, em freezer -80°C, no meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de antibiótico e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Alemanha).

4.2 ELETROFISIOLOGIA CELULAR

As correntes macroscópicas de Na⁺ foram estudadas através da técnica de Patch-Clamp, no modo *Whole-Cell Voltage-Clamp* (Hamil et al., 1981). Após o repique celular, as células eram resuspendidas e plaqueadas em lamínulas redondas com 18 mm de diâmetro (Glasscyto, Brasil) e mantidas em placas de Petri (35x10 mm tissue culture dish; Sarstedt, Alemanha) com meio de cultura completo e em estufa úmida de CO₂ a 37°C. Após 48 horas, tempo necessário para a adesão e restabelecimento do

metabolismo celular, uma lamínula era transferida para uma nova placa e banhada por uma solução salina (Tyrode; ver composição no item “protocolos experimentais”).

Experimentos prévios foram realizados com as linhagens MACL-1 e MGSO-3 a fim de verificar qual seria o melhor protocolo à ser adotado. Os resultados demonstraram que as células apresentavam maior estabilidade utilizando um tempo de adesão de 48 horas e entre as passagens 14 e 15, sendo definido esse intervalo para todos os experimentos e para todas as linhagens.

Para os experimentos eletrofisiológicos, pipetas de vidro (1.5mm, não heparinizada; Perfecta Lab, Brasil) foram confeccionadas por um estirador vertical (PP-830; Narishige, Japão) e preenchidas com solução salina (composição no item “protocolos experimentais”); resistências variavam de 1,5 a 4,0 M Ω . Um fino fio de Ag/AgCl foi introduzido no interior da pipeta preenchida com a solução interna, e esse conjunto acoplado ao *headstage* conectado à entrada de um amplificador (EPC10 USB; HEKA Elektronik, Alemanha).

Com o auxílio de um microscópio invertido (Eclipse TS100; Nikon Instruments, Japão), eram selecionadas apenas células isoladas, aderidas, com morfologia arredondada, tamanho representativo da cultura celular e que apresentavam a membrana celular íntegra para a obtenção dos registros. Após a aproximação da pipeta à membrana plasmática, através da utilização de micromanipulador Piezo (MP285; Sutter Instruments, EUA), uma sucção suave no interior da micropipeta era realizada para a formação do “gigaselo” (um contato estreito entre a pipeta e a membrana celular, cuja resistência elétrica alcança valores maiores que 10⁹ Ω). A configuração de *whole-cell* foi obtida após uma sucção subsequente mais vigorosa, onde houve o rompimento da membrana celular e a diálise da solução interna no meio intracelular.

O acompanhamento da resistência elétrica e do transiente capacitivo da pipeta e da célula, bem como os ajustes eletrônicos necessários para a realização da técnica, foram feitos através do *software* Patch-Master (HEKA Elektronik, Alemanha). As células apresentaram uma resistência em série entre 3,0 e 7,0 M Ω ; para nenhum dos registros foi realizada a compensação da mesma. As correntes foram filtradas (tipo Bessel) passa-baixa a 2,9 kHz fixo e o vazamento foi subtraído para todos os registros.

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Ativação dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem

O protocolo utilizado para a avaliação da presença de correntes macroscópicas de influxo, produzidas pela ativação de canais de Na⁺, partia de um potencial de *holding* de -50 mV, seguido de um pré-pulso hiperpolarizante de -120 mV por 150 ms. Pulsos despolarizantes foram aplicados partindo de um potencial de -90 mV até 60 mV, com intervalos de 10 mV, por 10 ms; entre cada um dos pulsos era dado um intervalo de 2 segundos (**Figura 11**). O potencial de junção foi calculado e apresentou um valor de 4,5 mV em 25°C. Para os experimentos realizados com tetrodotoxina (T8024; Sigma-Aldrich, EUA), o mesmo protocolo era aplicado antes e após a aplicação de TTX à 100nM (diluição da droga foi feita em solução de Tyrode), que foi feito manualmente com o auxílio de uma pipeta automática.

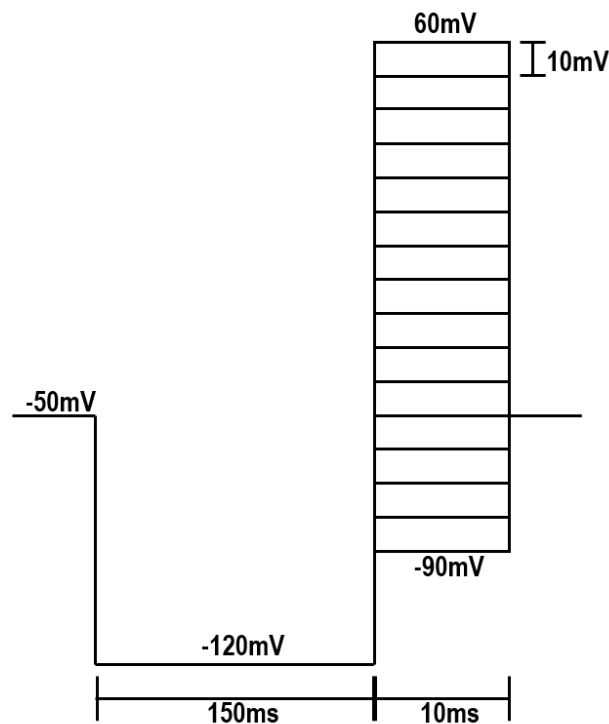


Figura 11. Protocolo de corrente/voltagem (I x V) utilizado para os experimentos de *voltage-clamp*, no modo *whole-cell*.

A solução de Tyrode utilizada nesses experimentos teve a seguinte composição (em mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 10 HEPES e 10 Glicose; o pH da solução foi ajustado para 7,4 adicionando NaOH a 1,0 M. Já a solução de pipeta foi composta por (em mM): 10 NaCl, 130 CsCl, 20 TEACl, 5 EGTA e 10 HEPES (o pH foi ajustado para 7,2 com a adição de CsOH ou TEAOH). Para que apenas a corrente de sódio fosse registrada, utilizou-se Cs⁻ e TEA⁺ na solução de pipeta para a inibição de vários tipos de canais de K⁺. O EGTA também foi adicionado a esta solução, por ser um agente quelante de grande afinidade por Ca²⁺, reduzindo a disponibilidade desses íons e possível visualização de correntes dessa natureza. Todas as soluções eram mantidas em banho de gelo durante a execução do experimento.

4.4 WESTERN-BLOT

As células em cultura, ao atingir uma confluência de 70 a 90%, eram submetidas ao protocolo de extração de proteínas totais. Primeiramente, o meio de cultura era removido e 3 mL de Tyrode eram adicionados a garrafa de cultura (75 cm²); durante 3 minutos era realizada uma leve agitação da garrafa, permitindo a passagem da solução salina por toda a superfície da garrafa para auxiliar na remoção de quaisquer debris celular. O Tyrode é, então, removido e 500 µL de tampão de lise (Bio-Rad Laboratories, EUA) com inibidores de proteases (P2714; Sigma-Aldrich, EUA) eram adicionados a garrafa e, com o auxílio de um *cell scraper* (Sarstedt, Alemanha), era feita a remoção das células aderidas.

O conteúdo era removido e transferido para um tubo eppendorf; 6 ciclos de homogeneização (5 sucções com a pipeta) com 5 minutos de descanso foram realizados. Ao final, a amostra era centrifugada por 12 minutos, a 8.000 rpm, em uma temperatura de 4°C; o sobrenadante era removido e aliquoteado para armazenamento em freezer - 80°C para uso posterior. A quantificação das proteínas totais presentes em cada amostra foi feita utilizando o método de Lowry, conforme descrito anteriormente (Lowry *et al.*, 1951).

Os volumes correspondentes à 30µg de proteínas, para cada uma das linhagens celulares, foram aplicados nas canaletas de um gel de poli(acrilamida (8%) (30%

Acrylamide/Bis Solution; Bio-Rad Laboratories, EUA), juntamente com o padrão de massa molecular (Precision Plus Protein Standards; Bio-Rad Laboratories, EUA), para a separação das proteínas de acordo com sua carga e massa molecular. Posteriormente, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P; EMD Millipore, EUA), previamente sensibilizada. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau 0,5% (Ponceau S; AMRESCO, EUA), seguido por 3 lavagens de 5 minutos com PBS-Tween (0,3%) (Tween 20; AMRESCO, EUA). Foi realizado o bloqueio da membrana com leite em pó (5%) (Molico Desnatado; Nestlé, Suíça) diluído em PBS-Tween por 1 hora e, então, incubada *overnight* com uma solução contendo 5% de leite em pó (diluído em PBS-Tween) com os anticorpos das proteínas de interesse (**Tabela 3**). 3 lavagens de 5 minutos com PBS-Tween foram realizadas e o anticorpo secundário (também diluído em solução de 5% de leite em pó em PBS-Tween) adicionado.

Após 2 horas, a membrana passou novamente por 3 lavagens com PBS-Tween e foi revelada por detecção quimioluminescente (Luminata; Amersham Biosciences, Reino Unido) (ImageQuant LAS 4000; General Electric, EUA).

Anticorpos	Diluição	Fonte
Nav 1.5	1:1000	Abcam (ab56240)
Nav 1.6	1:800	Abcam (ab65166)
Nav 1.7	1:800	Abcam (ab65167)
β -actina	1:1000	Santa Cruz (sc69879)
Rabbit	1:2000	Sigma-Aldrich (A0545)
Mouse	1:1000	

Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados para os experimentos de Western-blot.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a realização da imunohistoquímica, as células em cultura foram tripsinizadas e centrifugadas a 3000 rpm por 30 segundos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 5mL de uma solução de formol neutro tamponado com 30% de álcool 70% foi adicionado para a fixação do material. Após 24 horas, o pellet formado era cuidadosamente removido e transferido para um papel filtro (J Prolab, Brasil), seguido pela aplicação de uma gota de eosina. O pellet celular era, então, envolto pelo papel filtro, armazenado em um cassete histológico devidamente identificado e mantido em álcool 70%.

Para a parafinização e inclusão, as amostras passavam por uma bateria de processamento composta por álcool (70%, 80%, 90%, Absoluto I e II), xilol I e II, e parafina I e II; 20 minutos em cada solução para posterior inclusão do pellet em parafina. As lâminas gelatinizadas contendo cortes de 4 μ m de espessura foram desparafinizadas em xilol e álcool, e hidratadas para a imunomarcção, de acordo com a metodologia ABC (estreptoavidina-biotina-peroxidase), utilizando os anticorpos isolados em lâminas separadas.

As reações de recuperação antigênica foram feitas em calor úmido pressurizado (Pascal[®]) ou em banho-maria com citrato pH 6,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution; Dako, Dinamarca) a 125°C e 94°C, respectivamente, seguido de um resfriamento das cubas por 20 minutos. Para o marcador dos canais Nav1.6 foi utilizado o protocolo com a Pascal, enquanto para os demais canais (Nav1.5 e Nav1.7) foi utilizado o banho-maria. Na sequência, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos em PBS, o bloqueio da peroxidase (3 vezes de 5 minutos) e da proteína endógena (15 minutos) a temperatura ambiente, com 3 lavagens em PBS entre os dois bloqueios.

As amostras foram então recobertas pelos anticorpos primários com um tempo de incubação *overnight* em temperatura 8°C (**Tabela 4**). No dia seguinte, após 16 horas de incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos, sendo realizada novamente 3 lavagens em PBS e aplicação do polímero, por mais 30 minutos. Foram utilizados todos os reagentes do Kit Novolink (Leica Biosystems, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante.

A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina (DAB) (Novolink; Leica Biosystems, Reino Unido) por 3 minutos, onde foi diluído 50µl de DAB para 1 mL de diluente 15 minutos antes da aplicação, também conforme instruções do fabricante. A contra coloração foi feita com Giemsa em todas as imunomarcações. A análise das lâminas se baseou na contagem de 1.000 células, em diferentes campos, que foram agrupadas de acordo com suas características morfológicas e/ou imunomarcação.

Anticorpo	Diluição	Fonte
Nav 1.5	1:300	Abcam (ab56240)
Nav 1.6	1:600	Abcam (ab65166)
Nav 1.7	1:800	Abcam (ab65167)

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados para a imunohistoquímica.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para análise estatística dos dados eletrofisiológicos foi utilizado o test t de Student na sua forma não-pareada. As comparações entre os dados obtidos pelo *Western-Blot* foram realizadas com o teste de análise da variância (ANOVA *one-way*) com o pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Foi aceito como diferença estatisticamente significativa qualquer comparação que resultou em um $p < 0,05$. Foram usados os softwares Fitmaster (versão 2x90.2; HEKA Elektronik, Alemanha) para as análises eletrofisiológicas, o software ImageQuant TL (General Electric, EUA) para análise das imagens do *Western-Blot* e quantificação das proteínas, e Graph Pad Prism 5 (GraphPad, EUA) para a confecção dos gráficos e ajustes utilizando regressão não-linear. Excel (versão 2013; Microsoft, EUA) e o Graph Pad Prism 5 foram usados para a realização das análises estatísticas.

5 RESULTADOS

5.1 AS LINHAGENS MACL-1 E MGSO-3 APRESENTAM CORRENTES DE ENTRADA COM PROPRIEDADES SEMELHANTES ÀS PRODUZIDAS POR CANAIS DE Na⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM.

Para verificar a presença de correntes de Na⁺ nas linhagens celulares de tecido normal e tumoral da mama, utilizou-se a técnica de *patch-clamp*. De acordo com os registros obtidos, não foi observado correntes de influxo nas linhagens MCF-10A e MDA-MB-231 (**Figura 12**). Entretanto, a partir de potenciais menos negativos (entre -10 e 0 mV), a presença de uma corrente sustentada de efluxo pode ser medida nestas células; a natureza dessa corrente ainda permanece indefinida. Já para as células MACL-1 e MGSO-3, correntes de entrada eram visualizadas a partir de -40 mV, levantando a hipótese da presença de VGSC.

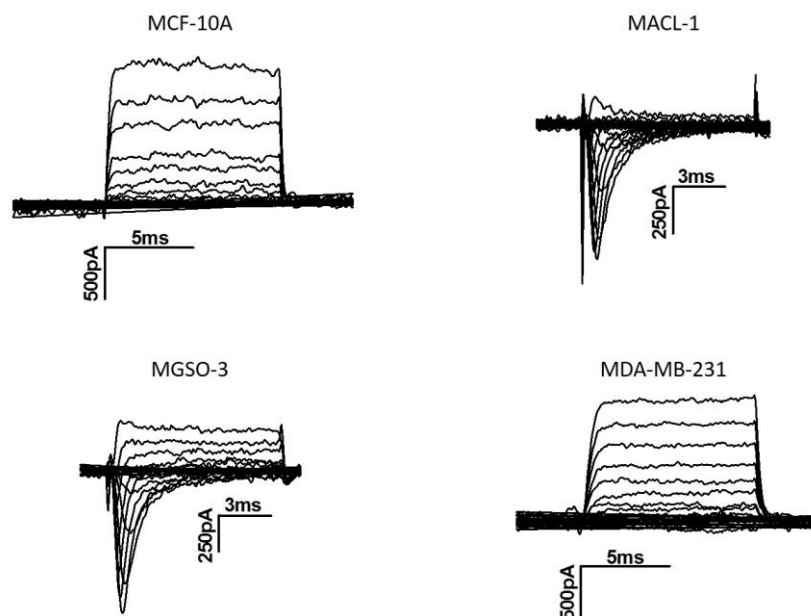


Figura 12. Família de traçados representativos obtidos para as linhagens celulares de mama normal (MCF-10A) e tumorais (MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231). As células foram mantidas em um potencial de holding de -50 mV e um pré-pulso hiperpolarizante de -120 mV foi aplicado. As células foram despolarizadas de -90 mV até 50 mV em intervalos crescentes de 10 mV.

As **Figuras 13A e 13B** apresentam os registros obtidos em resposta a um pulso despolarizante de 0 mV para MACL-1 e MGSO-3, respectivamente. A média para corrente máxima na linhagem MACL-1 foi de $-523,66 \pm 70,4$ pA e de $-557,93 \pm 94,8$ pA na MGSO-3. A relação entre a densidade de corrente obtida e o potencial de membrana é apresentada nas **Figura 13C e 13D**. A corrente máxima, para ambas as células, foi atingida em potenciais próximos a 0mV, com valores médios de $-12,68 \pm 1,29$ pA/pF em MACL-1 (símbolos vermelhos; n=21) e $-13,40 \pm 2,35$ pA/pF em MGSO-3 (símbolos azuis; n=15).

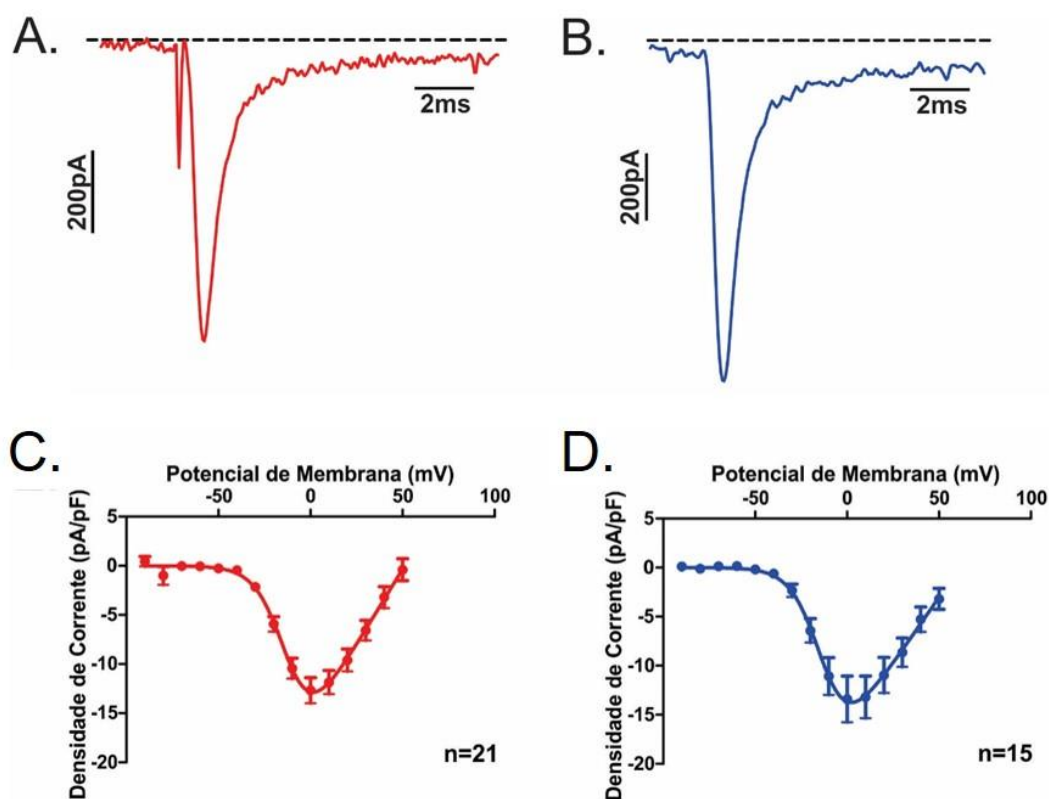


Figura 13. Registros representativos obtidos para MACL-1 (A) e MGSO-3 (B) em 0 mV. A relação I x V para MACL-1 (C) e MGSO-3 (D) também foram apresentadas; os pontos indicam a média \pm EPM. Linha contínua representa o ajuste da função de Boltzmann (regressão não-linear) aos dados experimentais.

Os valores encontrados para a capacitância celular nos mostram uma homogeneidade quanto ao tamanho das células escolhidas para a técnica, com médias de $42,68 \pm 4,61$ pF (MACL-1) e $42,24 \pm 3,47$ pF (MGSO-3); não houve diferença significativa (**Figuras 14A e 14B**). Comparando os resultados das duas linhagens celulares, ambas as correntes ativam em -40 mV e atingem o seu pico em 0 mV (**Figura 14C**), sem diferença significativa entre o pico da corrente (**Figura 14D**). O potencial de reversão foi calculado em $51,13 \pm 2,27$ mV para MACL-1 e em $61,25 \pm 5,30$ mV para MGSO-3 (**Figura 14F**), ficando próximo de 60 mV, que nas condições experimentais utilizadas é igual ao valor do potencial de equilíbrio eletroquímico do sódio.

A dependência de voltagem para a ativação estacionária, para ambas linhagens celulares, está representada na **Figura 14E**, onde podemos observar os valores de $V_{1/2}$ para MACL-1 ($-12,50 \pm 0,26$ mV) e para MGSO-3 ($-13,38 \pm 0,33$ mV). A análise estatística não mostrou diferença significativa entre as linhagens para nenhum dos valores acima.

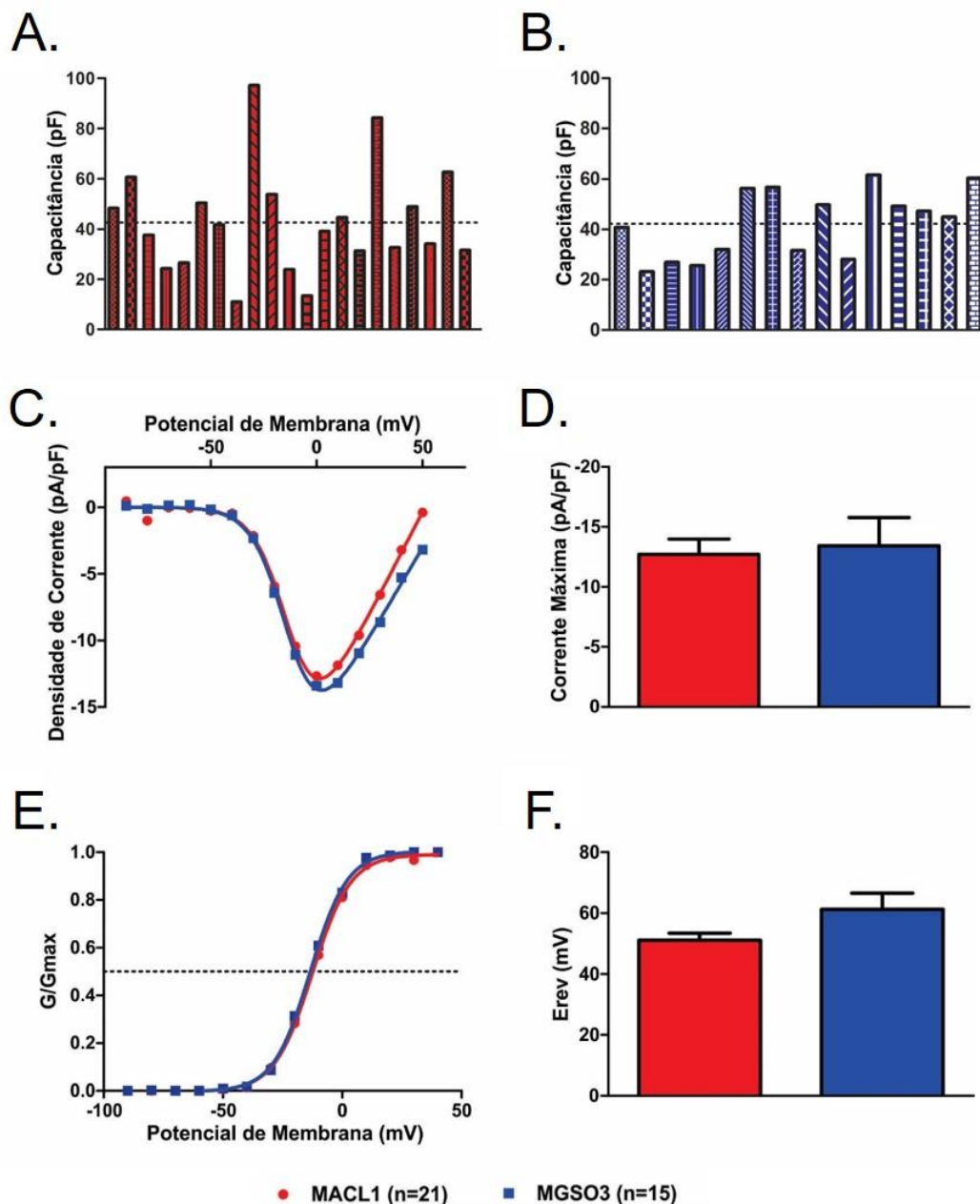


Figura 14. Análise comparativa dos resultados obtidos para as linhagens MACL-1 e MGSO-3. Valores de capacitância celular de MACL-1 (A) e MGSO-3 (B). A média para a capacitância (linha tracejada) foi $42,68 \pm 4,61$ pF (MACL-1; n=21) e $42,24 \pm 3,47$ pF (MGSO-3; n=15). (C) Relação densidade de corrente vs. potencial de membrana. Símbolos vermelhos representam os valores médios obtidos para a linhagem MACL-1 (n=21) e símbolos azuis representam os valores para a linhagem MGSO-3 (n=15). (D) As barras representam a média \pm EPM para o pico da densidade de corrente medida em 0 mV. MACL-1 = $-12,68 \pm 1,29$ pA/pF (Barra vermelha) e MGSO-3 = $-13,40 \pm 2,35$ pA/pF (Barra azul). (E) Ativação no estado estacionário. Linha tracejada indica que 50% da

população de canais iônicos estão ativados. (F) As barras representam a média \pm EPM para o potencial de reversão. MACL-1 = $51,13 \pm 2,27$ mV (Barra vermelha) e MGSO-3 = $61,25 \pm 5,30$ mV (Barra azul). As curvas em C e E foram feitas seguindo a equação de Boltzmann (regressão não-linear). Os parâmetros analisados (Gmax, Erev, Slope, $V_{0,5}$ e Corrente Máxima) não atingiram significância estatística considerando $p < 0,05$.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que as células de tumor primário de mama (MACL-1 e MGSO-3) apresentam correntes de entrada geradas pela ativação de canais de Na^+ . Já as células de tecido normal e de tumor metastático de mama (MCF-10A e MDA-MB-231) apresentam uma corrente sustentada de efluxo de origem ainda desconhecida.

5.2 AS CÉLULAS MACL-1 E MGSO-3 DIFEREM QUANTO A POPULAÇÃO DE VGSC EXPRESSOS EM SUA MEMBRANA CELULAR.

Apesar de identificarmos a presença de I_{Na^+} para as linhagens de tumor primário, nós utilizamos uma das propriedades farmacológicas apresentadas por esses canais, a sensibilidade à tetrodotoxina, com o intuito de confirmar os dados anteriores e identificar possíveis diferenças quanto a composição da população de canais existentes em cada linhagem.

Para tal, registros foram realizados (segundo o mesmo protocolo) antes e após a aplicação de 100nM de tetrodotoxina. Os traçados representativos para as correntes observadas em 0 mV, com e sem a presença de TTX, estão apresentados nas **Figuras 15A** (MACL-1) e **15B** (MGSO-3). Observamos uma inibição da I_{Na^+} de 100% para MACL-1, com uma diferença na densidade de corrente de -14.71 ± 1.2 pA/pF em 0 mV entre antes e depois da administração da toxina (**Figura 15C**). Estes resultados nos permitem dizer que, nas células MACL-1, a população de VGSC é composta por isotipos sensíveis a TTX.

Já os registros de células MGSO-3 mostraram uma inibição de aproximadamente 80% da I_{Na^+} , com uma variação na densidade de corrente de -17.31 ± 1.678 pA/pF em 0 mV (**Figura 15D**). Neste caso, foi observada a presença de uma corrente residual mesmo após a aplicação de 100nM de TTX, indicando a presença de VGSC resistentes à TTX. Outra observação foi a presença de correntes de efluxo em resposta a despolarização da membrana para potenciais menos negativos, após a inibição da I_{Na^+} pela adição de tetrodotoxina, para ambas as linhagens celulares.

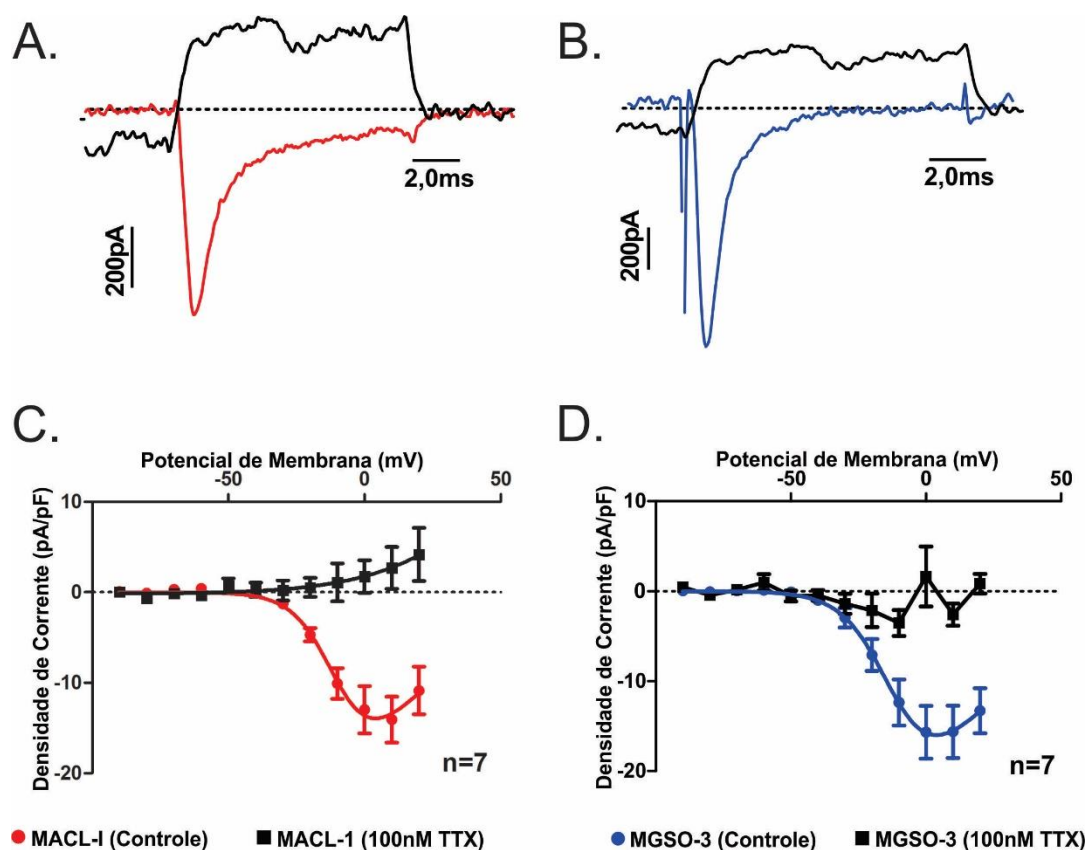


Figura 15. Inibição dos VGSC pela tetrodotoxina a 100nM. (A) Traçados representativos das correntes em 0 mV para MACL-1, antes (linha vermelha) e depois (linha preta) de 100nM de TTX. (B) Traçados representativos das correntes em 0 mV para MGSO-3, antes (linha azul) e depois (linha preta) de 100nM de TTX. (C) Relação densidade de corrente vs. potencial de membrana para a linhagem MACL-1 (n=7). Símbolos vermelhos representam os valores médios obtidos sem a presença de TTX; símbolos pretos representam os valores médios obtidos na presença de TTX. (D) Relação densidade de corrente vs. potencial de membrana para a linhagem MGSO-3 (n=7). Símbolos azuis representam os valores médios obtidos sem a presença de TTX. Símbolos pretos representam os valores médios obtidos na presença de TTX. As curvas de densidade de corrente em relação ao potencial de membrana foram obtidas utilizando a equação de Boltzmann; exceto para MGSO-3 (100nM TTX). Os valores são apresentados como média \pm EPM.

Com o intuito de identificar e quantificar os canais Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 presentes nas linhagens MACL-1 e MGSO-3 e confirmar a ausência destes nas linhagens MCF-10A e MDA-MB-231, utilizamos a técnica de *western-blot*. Os resultados obtidos, apresentados na **Figura 16**, nos mostram que há expressão da isoforma Nav1.5 apenas para as células MCF-10, MACL-1 e MGSO-3, enquanto MDA-MB-231 não apresentou nenhuma banda visível. A quantificação mostrou valores semelhantes para MCF-10 ($0,31 \pm 0,01$ u.a.) e para MACL-1 ($0,30 \pm 0,02$ u.a.); já para as células MGSO-3 observou-se uma redução de aproximadamente 60% na expressão desses canais ($0,13 \pm 0,03$ u.a.).

Os géis que foram marcados com os anticorpos para os canais Nav1.6 e Nav1.7 apresentaram a presença de várias proteínas com diferentes pesos moleculares. Nenhuma banda típica para os canais Nav1.6 foi identificada, enquanto apenas as linhagens MACL-1 e MGSO-3 apresentaram expressão para o Nav1.7, com os valores de $0,06 \pm 0,04$ u.a. e $0,04 \pm 0,01$ u.a., respectivamente. Considerando que o peso molecular da subunidade α dos VGSC é de aproximadamente 260 kDa, a análise dos nossos resultados nos permite concluir que a linhagem MCF-10A expressa canais do tipo Nav1.5, as linhagens MACL-1 e MGSO-3 expressam dois tipos de canais, o Nav1.5 e o Nav1.7; já a linhagem metastática MDA-MB-231 não apresentou níveis detectáveis para nenhum dos três tipos de canais de Na^+ avaliados.

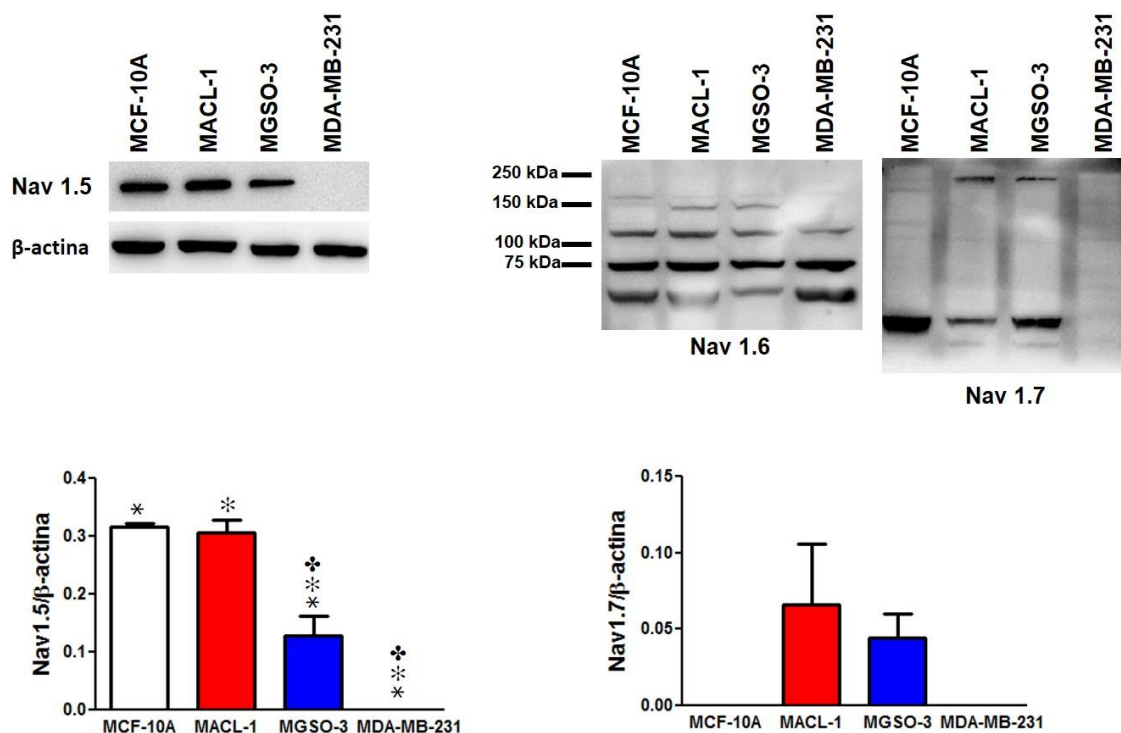


Figura 16. Expressão de Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 em células de diferentes linhagens celulares. Imagens representativas de uma banda típica de Nav1.5 e β -actina (painel da esquerda), e dos géis obtidos para Nav1.6 e Nav1.7 (painel da direita) com marcação para mais de uma proteína. Os níveis de expressão foram normalizados com a β -actina. A quantificação de Nav1.5 (a esquerda) foi de $0,31 \pm 0,01$ (MCF-10A, Barra Branca), $0,30 \pm 0,02$ (MACL-1, Barra Vermelha), $0,13 \pm 0,03$ (MGSO-3, Barra Azul). A quantificação de Nav1.7 (a direita) considerou-se apenas a banda superior (≈ 250 kDa) e apresentou os valores de $0,06 \pm 0,04$ (MACL-1, Barra Vermelha) e $0,04 \pm 0,01$ (MGSO-3, Barra Azul). Utilizou-se ANOVA one-way para análise da variância e teste de Tukey para comparação entre grupos; $p < 0,05$ ($n=2$). *MCF-10A x MGSO-3 e MCF-10A x MDA-MB-231. *MACL-1 x MGSO-3 e MACL-1 x MDA-MB-231. ❖MGSO-3 x MDA-MB-231.

5.3 OS CANAIS DE Na⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM ESTÃO LOCALIZADOS EM DIFERENTES COMPARTIMENTOS CELULARES.

Apesar da identificação molecular nos esclarecer quanto a presença ou ausência de determinada isotipo, os resultados não explicam totalmente alguns registros obtidos com a eletrofisiologia. Na linhagem MCF-10A, por exemplo, não foi registrado nenhuma I_{Na⁺}, apesar da expressão de Nav1.5 ter sido identificada pelo *western-blot*. Para verificarmos essa questão, a localização dos VGSC foi investigada através da técnica de imunohistoquímica (IHQ). As imagens apresentadas na **Figura 17** demonstram a eficácia e boa padronização do protocolo adotado para estes experimentos.

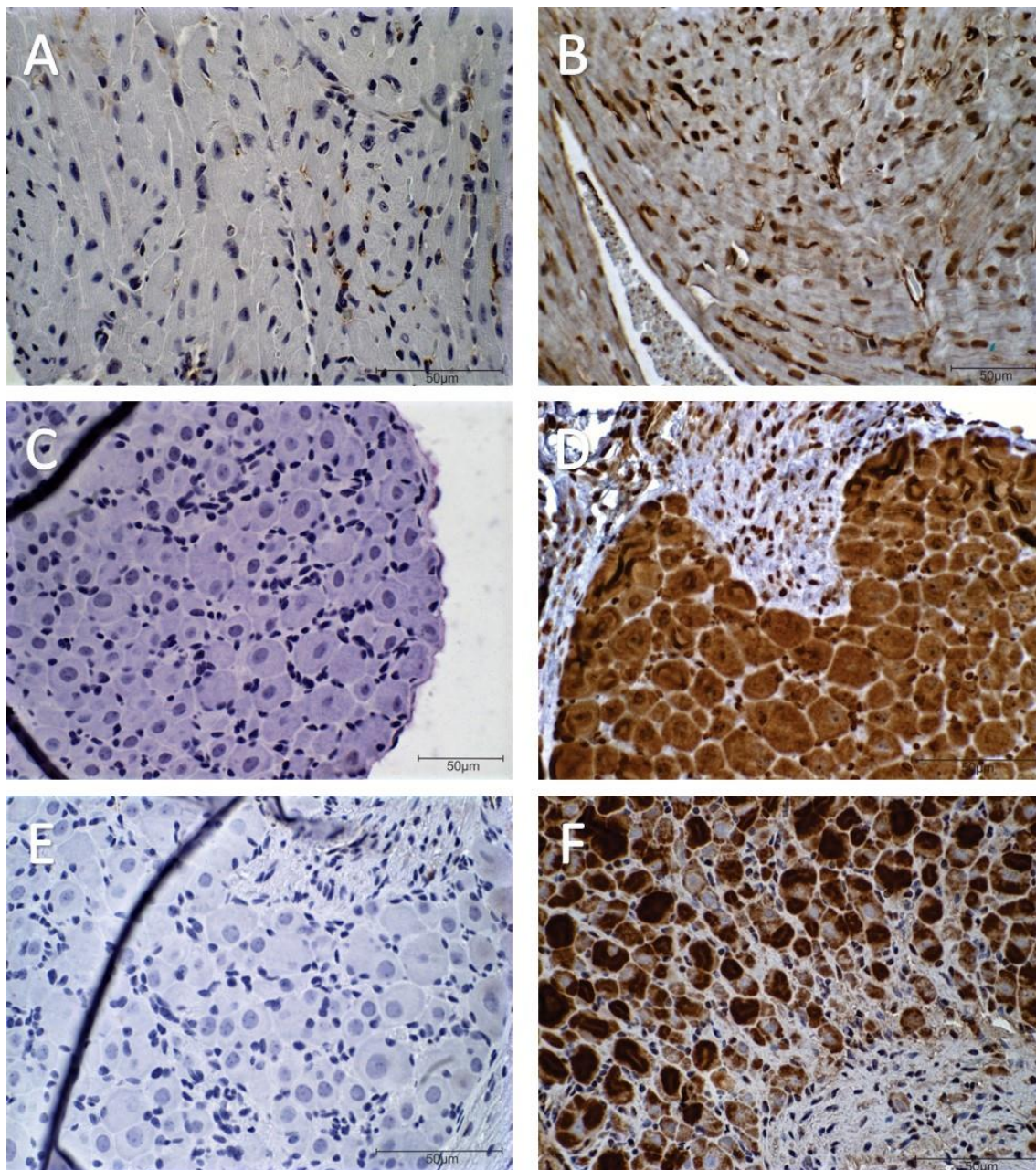


Figura 17. Imagens representativas dos controles positivo e negativo para as imunomarcações dos canais Nav1.5 (A e B), Nav1.6 (C e D) e Nav1.7 (E e F). Imagens da esquerda correspondem aos controles negativos, enquanto as imagens da direita aos controles positivos. Para a avaliar a imunomarcação do anticorpo para Nav1.5 utilizou-se músculo cardíaco (ventrículo esquerdo e direito) de camundongo; já para os demais canais utilizou-se gânglios da raiz dorsal de camundongos. Imagens obtidas em aumento de 40X (B,C) ou 60X (A,D,E,F).

A imunohistoquímica demonstrou uma marcação quase que total das células MCF-10A (92%), MACL-1 (92%) e MGSO-3 (96%) para o isotipo Nav1.5, enquanto MDA-MB-231 apresentou uma marcação de apenas 12% de suas células (**Figura 18**). Durante a análise microscópica das lâminas obtidas, observamos a presença de uma marcação do espaço nuclear e da membrana nuclear. Para algumas células, estas duas marcações estavam associadas, sendo que a marcação da membrana nuclear se apresentou concentrada apenas em alguns pontos da membrana (*clusters*).

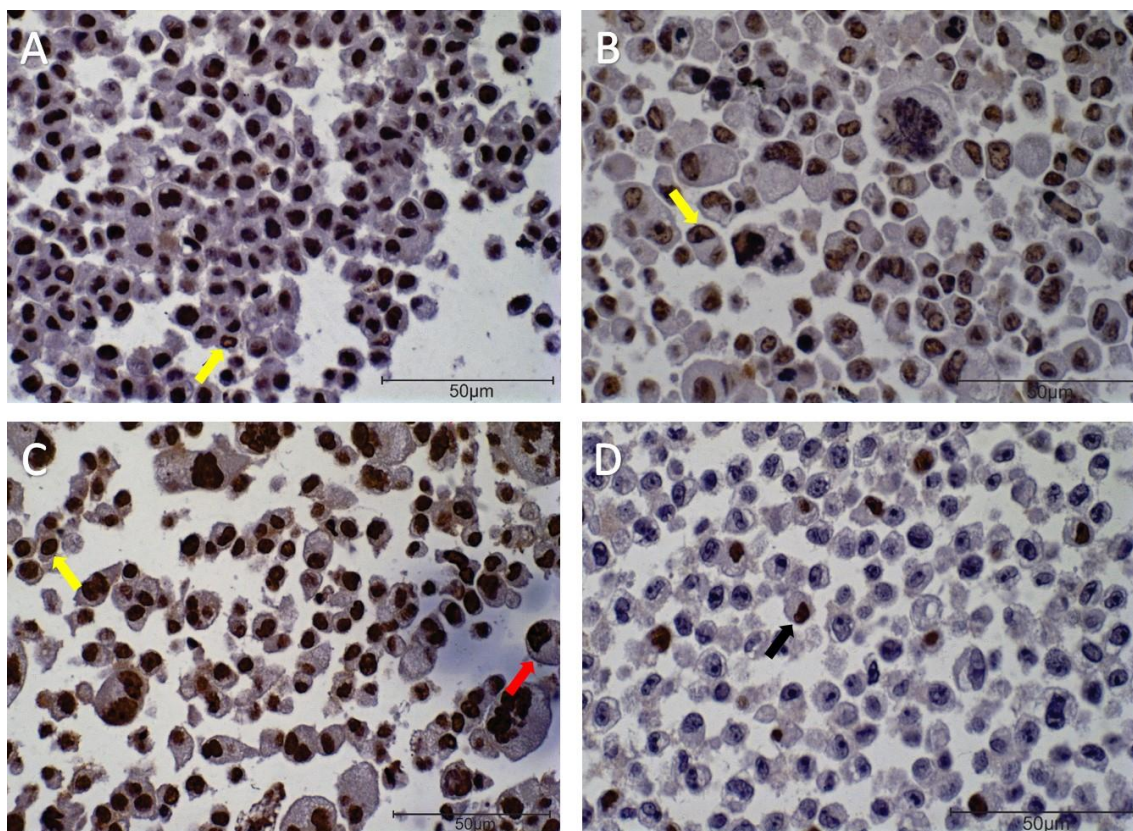


Figura 18. Imagens representativas da imunohistoquímica dos canais Nav1.5. Imunomarcações para as linhagens MCF-10A (A), MACL-1 (B), MGSO-3 (C) e MDA-MB-231 (D). Setas amarelas indicam a marcação da membrana nuclear e as setas vermelhas indicam a marcação da membrana citoplasmática. A seta preta (D) indica as células positivas para a presença dos canais Nav1.5. Imagens obtidas em aumento de 60X.

Já para os canais Nav1.6, todas as linhagens celulares demonstraram a presença de 100% de células positivas para a presença desse canal (**Figura 19**). Neste caso, e diferentemente das marcações apresentadas anteriormente, a presença do produto castanho era visualizada, não apenas no espaço nuclear, como também no citoplasma das células. Já a marcação membranar também estava presente na membrana celular para algumas células das linhagens MCF-10A (4%), MACL-1 (5%) e MGSO-3 (8%).

A marcação da membrana nuclear para Nav1.6 também foi visualizada nas células MDA-MB-231 e MCF-10A. Foram identificados dois padrões diferentes de marcação, em alguns pontos da membrana, como se formassem *clusters*, ou em toda a sua extensão para as células metastáticas. Além disso, ambas as linhagens apresentaram células cujo nucléolo se encontrava sem marcação.

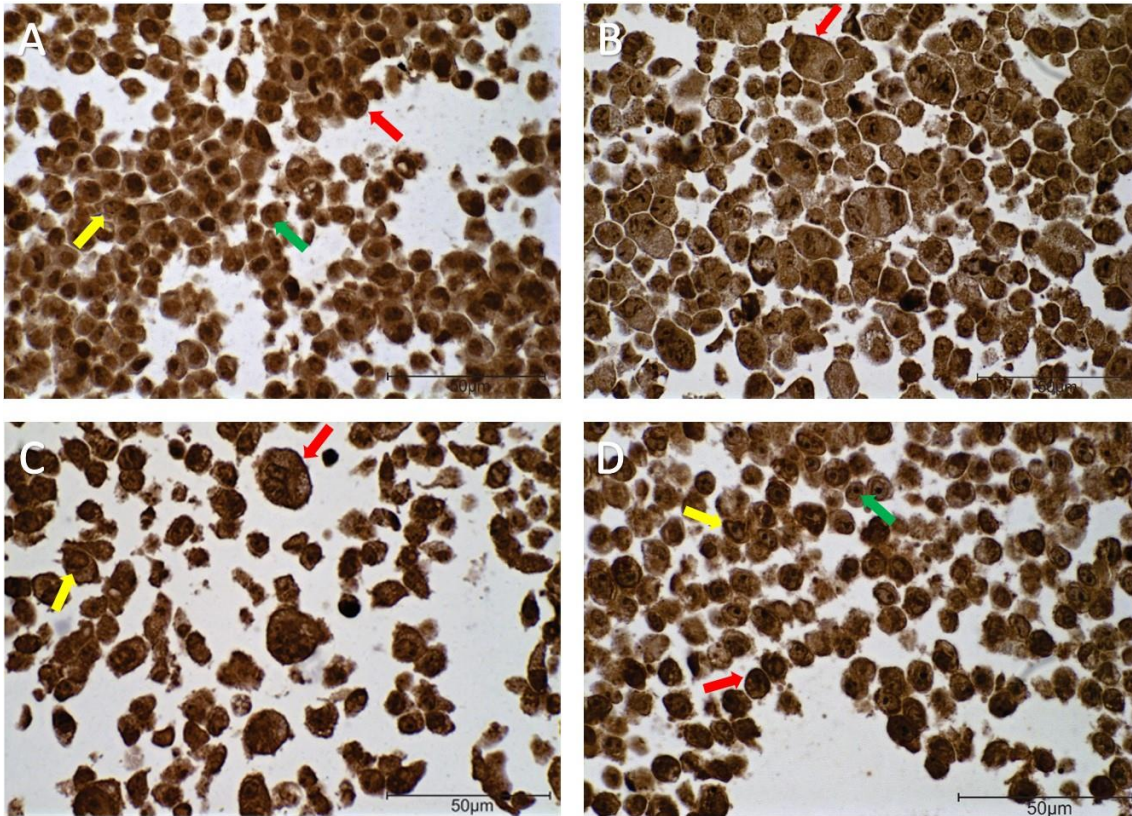


Figura 19. Imagens representativas da imunohistoquímica dos canais Nav1.6. Imunomarcações para as linhagens MCF-10A (A), MACL-1 (B), MGSO-3 (C) e MDA-MB-231 (D). Setas amarelas indicam a marcação da membrana nuclear, as setas vermelhas indicam a marcação da membrana citoplasmática e as setas verdes indicam a presença de nucléolo não-marcado. Imagens obtidas em aumento de 60X.

Resultados similares foram observados na imunohistoquímica realizada para o isotipo Nav1.7. As células positivas para a expressão desses canais, apresentaram marcação em todo o citoplasma e espaço nuclear, com aproximadamente 100% de células marcadas (100% para MCF-10A e MDA-MB-231, e 99% para MACL-1 e MGSO-3) (**Figura 20**). A presença de canais na membrana celular foi observada apenas para as linhagens MACL-1 (2%), MGSO-3 (5%) e MDA-MB-231 (4%); já a marcação da membrana nuclear foi observada para células de todas as linhagens, podendo estar associadas ou não com a marcação da membrana citoplasmática. Outra observação bastante expressiva foi a presença do nucléolo não-marcado para 46% das células analisadas de MDA-MB-231.

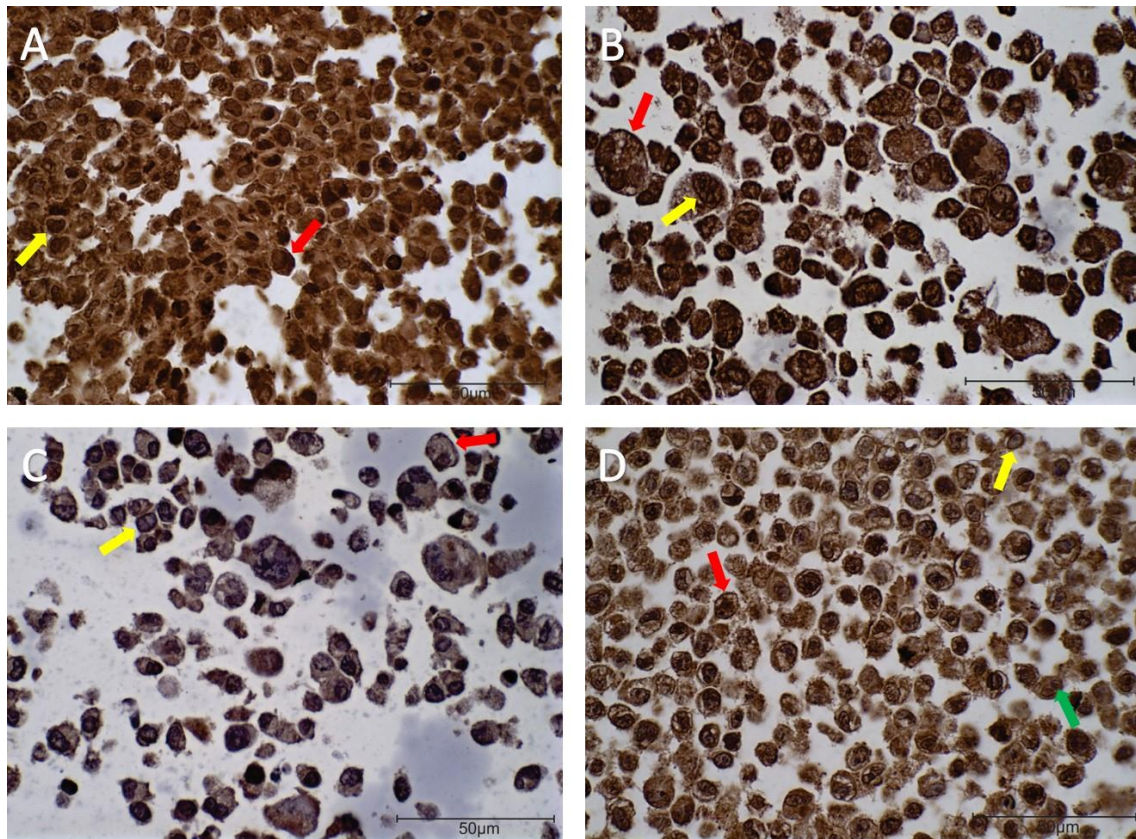


Figura 20. Imagens representativas da imunohistoquímica dos canais Nav1.7. Imunomarcações para as linhagens MCF-10A (A), MACL-1 (B), MGSO-3 (C) e MDA-MB-231 (D). Setas amarelas indicam a marcação da membrana nuclear, as setas vermelhas indicam a marcação da membrana citoplasmática e as setas verdes indicam a presença de nucléolo não-marcado. Imagens obtidas em aumento de 60X.

Os resultados observados durante a análise microscópica das lâminas obtidas pela imunohistoquímica foram compilados e apresentados na **Tabela 05**. De forma geral, podemos dizer que todas as linhagens celulares analisadas apresentam a expressão dos canais de Na^+ dependentes de voltagem Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7 com concentrações e padrões de expressão diferentes.

		MCF-10	MACL-1	MGSO-3	MDA-MB-231
Nav 1.5	Células Positivas	93%	92%	96%	12%
	Células Negativas	7%	8%	4%	88%
	Tipo de Marcação	MN, MMN(+)	MN, MMN(++)	MN, MMC(+), MMN(+)	MN, MMN(++)
Nav 1.6	Células Positivas	100%	100%	100%	100%
	Células Negativas	0%	0%	0%	0%
	Tipo de Marcação	MCN, MMC(+), MMN(+), NNM(+)	MCN, MMC(+)	MCN, MMC(+), MMN(+)	MCN, MMC(+), MMN(++), NNM(+++)
Nav 1.7	Células Positivas	100%	99%	99%	100%
	Células Negativas	0%	1%	1%	0%
	Tipo de Marcação	MCN, MMN(+++)	MCN, MMC(+), MMN(++)	MC, MN(+), MMC(+), MMN(++)	MCN, MMC(++), MMN(+++), NNM(+++)

Tabela 05. Compilação dos resultados obtidos pela análise microscópica das lâminas de imunohistoquímica para os canais Nav1.5, Nav1.6 e Nav1.7. A análise se baseou na contagem de 1.000 células para cada lâmina, em campos diferentes, que foram classificadas de acordo com a presença ou não de marcação (células positivas e negativas) e do tipo de marcação que apresentavam. Neste último caso, foi adotado um sistema de graduação, sinalizado por cruzes (+), para as marcações que não estavam presentes em todas as células. MN, Marcação do espaço nuclear. MCN, Marcação do citoplasma e do espaço nuclear. MMN, Marcação da membrana nuclear. MMC, Marcação da membrana celular. NNM, Nucléolo não-marcado. +, 0 a 10%. ++, 11 a 30%. +++, 31 a 50%.

6 DISCUSSÃO

Apesar da associação às células excitáveis e sua participação na gênese do potencial de ação, os canais de Na^+ já foram identificados em diferentes tipos de tumores, como próstata (Laniado et al., 1997; Smith et al., 1998; Diss et al., 2001), pulmão (Onganer e Djamgoz, 2005; Roger et al., 2007), ovário (Gao et al., 2010) e melanomas (Allen, Lepple-Wienhues e Cahalan, 1997). Um dos primeiros trabalhos que apresentou dados que confirmavam a presença de VGSC em tumores de mama foi de Fraser e colaboradores (2005), que identificaram a presença de correntes de influxo apenas em células metastáticas e de alto potencial invasivo, MDA-MB-231. Estas correntes eram produzidas, principalmente, por canais do tipo Nav1.5, que se apresentavam, em sua maioria, na isoforma neonatal (80%). A inibição destes canais mostrou uma redução na capacidade de migração, invasão e de endocitose das células tumorais.

Estes dados encontram-se em concordância com outros trabalhos publicados (Roger, Besson e Le Guennec, 2003; Onkal et al., 2008; Gao et al., 2009; Nelson et al., 2015), dando apoio a ideia que indica a participação desses canais no aumento da agressividade tumoral. De maneira geral, processos celulares como migração e crescimento celular, expressão de genes, perda da adesão e formação de vesículas já foram associados com os VGSC, mas ainda se sabe muito pouco sobre os mecanismos, ou seja, como a entrada de íons Na^+ regula e potencializa tais funções (Brackenbury, 2012; Besson et al., 2015).

Os dados apresentados pela literatura demonstram que há um aumento na expressão destes canais no estágio metastático e afirmam que esta alteração está associada a agressividade tumoral. Entretanto, o fazem sem investigar estágios anteriores do desenvolvimento tumoral. Nossos resultados indicam a presença de VGSC nos estágios iniciais do câncer de mama. A inibição dessas correntes, total ou parcial, em resposta a aplicação de 100 nM de tetrodotoxina, um potente inibidor de VGSC, confirmou a presença das isoformas Nav1.6 e Nav1.7 para ambas as linhagens primárias, e ainda de Nav1.5 apenas para MGSO-3. Por outro lado, os resultados obtidos com a

células MCF-10A estão de acordo com a literatura, ao contrário daqueles obtidos para MDA-MB-231. Nestas células, não verificamos correntes de influxo com a ativação de canais de Na⁺.

Sabe-se que, em resposta a despolarização da membrana celular, correntes de influxo com densidade próxima à 11,0 pA/pF são mensuradas em potências de -15 a -5 mV (Roger, Besson e Le Guennec, 2003). Entretanto, em nossos registros, nenhuma corrente de influxo foi medida para estas células ao despolarizá-las. Acreditamos que essa incoerência entre os resultados seja devido a diferença de passagem entre as células utilizadas em ambos os experimentos. Osborne e colaboradores (Osborne, Hobbs e Trent, 1987) demonstraram que a expressão de algumas proteínas pode ser alterada em células que se encontram em cultura por muitos anos. O aparecimento de subpopulações que apresentavam variações na taxa de crescimento e na expressão de receptores foi posteriormente confirmado por outros grupos (Bahia et al., 2002).

Pensando nessa mudança de padrão de expressão, algumas observações e questionamentos podem ser feitos, avaliando os resultados obtidos pela identificação molecular dos canais. Primeiramente, não visualizamos nenhuma banda característica para a marcação de Nav1.5, Nav1.6 ou Nav1.7 para MDA-MB-231, concordando com os nossos registros eletrofisiológicos. Entretanto, a literatura relata que células MDA-MB-231 apresentam a expressão de 3 isoformas dos VGSC: Nav1.5, que corresponde a aproximadamente 80% da expressão total dos canais, e o Nav1.6 e Nav1.7, que dividem os demais 20% da expressão. E ainda, para os canais Nav1.5, a expressão acontece sob a isoforma neonatal desse canal em quase sua totalidade (80%) (Fraser et al., 2005; Chioni et al., 2005; Brackenbury et al., 2007).

Apesar do não aparecimento de bandas visíveis para a linhagem metastática na identificação de canais Nav1.5, nossos resultados permanecem em concordância com a literatura, uma vez que utilizamos um anticorpo capaz de identificar apenas a isoforma adulta. Dessa forma, podemos inferir que células tumorais em um estágio primário apresentam uma grande quantidade de canais Nav1.5 em sua isoforma adulta e que, com a progressão do tumor e o aumento da agressividade, é observada uma modificação no padrão de expressão, com o aparecimento da isoforma neonatal.

Portanto, uma vez que identificamos correntes de sódio nos estágios iniciais e ausência destas, nas células normais e metastáticas, tal associação (entre VGSC e o aumento da agressividade tumoral) fica questionada. Além disso, os resultados apontam para a participação desses canais em funções relacionadas ao estabelecimento do tumor (tumorigênese). Ao contrário dos canais de Na^+ , a participação de outros canais, como Ca^{2+} e K^+ , vêm sendo também correlacionada com alterações na capacidade de proliferação e com o controle do ciclo celular em diferentes tipos de neoplasias, incluindo as que acometem a mama (Litan e Langhans, 2015).

Os registros eletrofisiológicos, associados aos resultados obtidos pelo *western-blot*, apontam para a participação das diversas isoformas analisadas de forma diferente no desenvolvimento do tumor e é outro ponto importante a ser considerado. Os dados apontam para a participação dos canais Nav1.7 e Nav1.5 nos estágios iniciais; se confirmados, estes resultados possibilitarão o estudo e o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes e que não apresentem tantos efeitos colaterais. Um bom exemplo é a utilização da isoforma neonatal e da sua identificação nos estágios metastáticos. A diferença estrutural encontrada entre as isoformas, adulto e neonatal, juntamente com o fato de que apenas células tumorais expressam esta proteína, fazem do nNav1.5 um excelente alvo terapêutico. Chioni e colaboradores (2005) desenvolveram um anticorpo policlonal capaz de identificar apenas os canais nNav1.5. Testes vêm sendo realizados *in vitro* e *in vivo*, e já mostram resultados promissores para o seu uso terapêutico.

Entretanto, os resultados da identificação molecular VGSC para MCF-10A discordam da literatura. A expressão destes canais não é considerada um processo fisiológico para células da mama; ou seja, é durante o processo de carcinogênese que tais genes são ativados. Para alguns tecidos, a expressão desses canais é constitutiva e somente se encontra alterada em tumores (Besson et al., 2015). Observamos, com nossos resultados, que a expressão de Nav1.5 ocorre para essa linhagem, mas a ativação destes canais se dá, provavelmente, na tumorigênese.

Uma banda típica para Nav1.5 foi identificada para MCF-10 e em densidade de expressão equivalentes àquelas encontradas para as células MACL-1. Apesar disso, nenhuma corrente de influxo foi medida para as células saudáveis, sustentando a hipótese da presença de proteínas, que apesar da expressão, se apresentam de maneira

não-funcional. Fourbon e colaboradores (2017) já mostraram que, apesar da presença e participação da subunidade α 1D (dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem) na regulação da concentração intracelular desse íon e na migração celular, nenhuma corrente de influxo foi medida.

Outra possibilidade é a associação destes canais com diferentes proteínas adaptadoras, como anquirina G, distrofinas e caveolinas, para a formação de complexos multiprotéicos que são capazes de modular a localização e função desses canais. A ativação dos VGSC através desses complexos, portanto, poderia desencadear diferentes respostas celulares (Mohler et al., 2004; Gavillet et al., 2006; Shibata et al., 2006; Tong et al., 2009; Yao, Fan e Jiang, 2011; Lin et al., 2012; Besson et al., 2015). Apesar da função de permeabilidade iônica necessitar apenas da subunidade α (Catterall, 2012), os VGSC podem apresentar em sua composição as subunidades β . Estas subunidades pertencem a família das imunoglobulinas e participam de várias atividades relacionadas a adesão celular (Isom et al., 1995; Yu et al., 2003). Não bastasse, também são substratos da quebra proteolítica por secretases; estudos apontam que o processamento dessas subunidades é essencial para a regulação da expressão gênica (Kim et al., 2005).

Após identificarmos a presença de VGSC Nav1.5 e Nav1.7 para as linhagens MACL-1 e MGSO-3, os esforços foram concentrados na localização destes canais no ambiente celular. A análise da IHQ mostrou uma expressão de todas as três isoformas para ambas as linhagens e contrária, em parte, alguns dos nossos resultados anteriores. A não identificação de Nav1.6 durante os experimentos de *western-blot*, em contraste com a alta marcação apresentada por estes canais na IHQ, levantam dúvidas quanto a especificidade do anticorpo utilizado para esta isoforma. Outro ponto que corrobora neste sentido, é a marcação de diversas bandas no gel obtido para Nav1.6.

Já os canais Nav1.5 e Nav1.7 mostraram concentrações e tipos de marcações muito semelhantes entre as duas linhagens celulares, quando comparadas; o que era esperado, já que ambas foram estabelecidas de tumores primários. Entretanto, o tipo de marcação visualizado para Nav1.5 foi diferente daquele observado para Nav1.7. Para o primeiro, a marcação se encontrava dentro do núcleo e na membrana nuclear; já para o Nav1.7, a marcação estava presente não apenas no espaço nuclear, como também no citoplasma e na membrana celular.

Alguns estudos demonstraram que a localização subcelular dos VGSC é essencial para o seu funcionamento fisiológico. Em neurônios, por exemplo, estes canais devem se concentrar no segmento inicial do axônio e nos nós de Ranvier (para neurônios mielinizados), para iniciar o potencial de ação e para a condução saltatória do mesmo, respectivamente (Calhoun e Isom, 2014; Kruger na Isom, 2016). Dessa forma, a localização desses canais em sítios alternativos, como o núcleo (seja na membrana ou no citoplasma nuclear) e o citoplasma, pode estar associado a ativação de vias necessárias para o desenvolvimento tumoral (Rhana et al., 2017) e a criação de ambiente propício para o seu desenvolvimento (Casey, Grinstein e Orlowski, 2010).

Para as células da linhagem MDA-MB-231, os nossos resultados parecem confrontar os da literatura. Apenas 12% das células mostraram marcação para os canais Nav1.5. Entretanto, a imunohistoquímica para Nav1.6 e Nav1.7 apresentaram 100% das células marcadas e nenhuma corrente de influxo foi verificada. Apesar de realizar vários experimentos, com diferentes passagens e soluções, o resultado se manteve. Acreditamos que uma melhor avaliação quanto a especificidade dos anticorpos utilizados para identificar os canais Nav1.6 e Nav1.7 se faz necessária, bem como a repetição dos experimentos com outros anticorpos a fim de confirmar os nossos achados. De forma geral, os resultados apontam para a participação dos canais de sódio no desenvolvimento do câncer de mama, com diferenças nas isoformas presentes, e a possível não participação dos mesmos no processo de metástase.

7 CONCLUSÃO

Com base no exposto, é possível concluir que:

- As células MACL-1 e MGSO-3, provenientes de tumores primários de mama, apresentam correntes de sódio com ativação dependente de voltagem, produzidas pelos canais Nav1.5 e Nav1.7;
- A identificação molecular dos isotipos Nav1.5 e Nav1.7 confirmam os dados eletrofisiológicos de MACL-1 e MGSO-3;
- Não é possível concluir sobre a expressão do isotipo Nav1.6 em nenhuma das linhagens celulares analisadas;
- A presença da imunomarcagem em quase todo o ambiente celular aponta para a participação desses canais em funções não-relacionadas ao transporte de íons.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AKRAM, M.; SIDDIQUI, S. Breast cancer management: Past, present and evolving. **Indian Journal of Cancer**, v. 49, n. 3, p. 277, 2012.

ALLEN, D.H.; LEPPLE-WIENHUES, A.; CAHALAN, M.D. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. **J Membr Biol**, v. 155, p. 27-34, 1997.

ALLISON, K. H. Molecular pathology of breast cancer: What a pathologist needs to know. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 138, n. 6, p. 770–780, 2012.

ARCANGELI, A.; BECCHETTI, A. Targeting ion channels in cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 21, n. 22, p. 11–19, 2015.

ARMSTRONG, C. M. Sodium channels and gating currents. **Physiological reviews**, v. 61, n. 3, p. 644–683, 1981.

BAHIA, H. *et al.* Karyotypic variation between independently cultured strains of the cell line MCF-7 identified by multicolour fluorescence in situ hybridization. **International journal of oncology**, v. 20, n. 3, p. 489–494, 2002.

BAN, K.A.; GODELLAS, C.V. Epidemiology of breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 23, n. 3, p. 409-22, 2014.

BANE, V. *et al.* Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. **Toxins**, v. 6, n. 2, p. 693–755, 2014.

BARNARD, M. E.; BOEKE, C. E.; TAMIMI, R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1856, n. 1, p. 73–85, 2015.

BÉLIVEAU, R.; DENIS GINGRAS, D. Clinical review - The role of nutrition in preventing cancer. **Canadian Family Physician**, v. 53, n. 11, p. 1905–1911, 2007.

BERG, W. A. *et al.* Combined Screening with Ultrasound and Mammography Compared to Mammography Alone in Women at Elevated Risk of Breast Cancer : Results of the First-Year Screen in ACRIN 6666. **Jama**, v. 299, n. 18, p. 2151–2163, 2009.

BESSION, P. *et al.* How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p. 2493-2501, 2015.

BISSEL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumors in context. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46–54, 2001.

BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 80, n. 2, p. 280–291, 2013.

BOUZA, A.A.; ISOM, L.L. **Voltage-Gated Sodium Channel β Subunits and Their Related Diseases**. Handbook of Experimental Pharmacology, p. 251-263, 2017.

BRACKENBURY, W. J. *et al.* The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 101, n. 2, p. 149–160, 2007.

BRACKENBURY, W. J. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. **Channels**, v. 6, n. 5, p. 352–61, 2012.

BRACKENBURY, W.J.; ISOM, L.L. Na Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. **Front Pharmacol**, v. 2, n. 53, 2011.

BRISSON, L. *et al.* Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. **Oncogene**, v. 30, n. 17, p. 2070–2076, 2011.

BRISSON, L. *et al.* Nav1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 21, p. 4835–4842, 2013.

BURDALL, S. E. *et al.* Breast cancer cell lines: Friend or foe? **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 2, p. 89–95, 2003.

CALHOUN, J.D.; ISOM, L.L. **The role of non-pore-forming β subunits in physiology and pathophysiology of voltage-gated sodium channels**. Voltage gated sodium channels, Berlin, Springer: pp. 51–89, 2014.

CASEY, J.R.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. Sensors and regulators of intracellular pH. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 1, p. 50-61, 2010.

CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 13–25, 2000.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 11, p. 2577–89, 2012.

CATTERALL, W. A.; SWANSON, T. M. Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. **Molecular pharmacology**, v. 88, n. 1, p. 141–50, 2015.

CATTERALL, W. A; GOLDIN, A. L.; WAXMAN, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 397–409, 2005.

Centro Integrado de Oncologia. **Câncer de Mama**. 2015. Disponível em: <<https://www.oncoassociados.com.br/cncer-de-mama>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

CHAMBERS, A.F.; GROMM, A.C.; MACDONALD, I.C. PRL-3 Expression in Metastatic Cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 15, p. 5607–5615, 2003.

CHIONI, A. M. *et al.* A novel polyclonal antibody specific for the Nav1.5 voltage-gated Na⁺ channel “neonatal” splice form. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 147, n. 2, p. 88–98, 2005.

COLEMAN, M.P. *et al.* Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). **Lancet Oncol**, v. 9, p. 730–56, 2008.

CORRÊA, N.C.R. *et al.* Genomic and phenotypic profiles of two Brazilian breast cancer cell lines derived from primary human tumors. **Oncology Reports**, p. 1299–1307, 2013.

COSTELLO, L. C.; FRANKLIN, R. B. The genetic/metabolic transformation concept of carcinogenesis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 31, n. 0, p. 123–130, 2012.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8 edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

DAI, X. *et al.* Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 2016.

DIABY, V. *et al.* A review of systematic reviews of the cost-effectiveness of hormone therapy, chemotherapy, and targeted therapy for breast cancer HHS Public Access. **Breast Cancer Res Treat**, v. 151, n. 1, p. 27–40, 2015.

DISS, J. **NoStudies of voltage-gated Na⁺ channel mRNA expression in rat and human carcinomas**. [s.l.] University of London, 2001.

DRIFFORT, V. *et al.* Ranolazine inhibits Nav1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. **Molecular cancer**, v. 13, n. 1, p. 264, 2014.

DUGGAL, S., ROBIN, J., & JULIAN, T. B. Ductal carcinoma in situ: an overview. **Expert Rev. Anticancer Ther.**, v. 13, n. 8, p. 955–962, 2013.

DUMALAON-CANARIA, J. A. *et al.* What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. **Cancer Causes and Control**, v. 25, n. 7, p. 771–785, 2014.

FAGUET, G. B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2022–2036, 2015.

FERLAY, J. *et al.* **GLOBOCAN: Cancer Incidence and Mortality Worldwide**. Lion, França: International Agency for Research on Cancer; 2013.

FOURBON, Y. *et al.* Ca²⁺ protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 14199, 2017.

FRASER, S. P. *et al.* Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis Human Breast Cancer Metastasis. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 15, p. 5381–5389, 2005.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–374, 2003.

GAO, R. *et al.* Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. **Oncol Rep**, v. 23, p. 1293-9, 2010.

GAO, R. *et al.* Functional expression of voltage-gated sodium channels Nav1.5 in human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences**, v. 29, n. 1, p. 64–67, fev. 2009.

GAVILLET, B. *et al.* Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. **Circ. Res.**, v. 99, p. 407–414, 2006.

GBD Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1659–1724, 2016.

GEY, G.O.; COFFMAN, W.D.; KUBICEK, M.T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res**, v. 12, p. 264–265, 1952.

GIANCOTTI, F. G. Deregulation of cell signaling in cancer. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2558–2570, 2014.

GIESS, C. S.; FROST, E. P.; BIRDWELL, R. L. Difficulties and errors in diagnosis of breast neoplasms. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 33, n. 4, p. 288–299, 2012.

GILLET, L. *et al.* Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 13, p. 8680–8691, 27 mar. 2009.

GRIMES, J. A. *et al.* Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. **FEBS Letters**, v. 369, n. 2–3, p. 290–294, 1995.

GUAN, X. Cancer metastases: Challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, 2015.

GURAY, M.; SAHIN, A. A. Benign Breast Diseases : Classification, Diagnosis, and Management. **The Oncologist**, v. 11, p. 435–449, 2006.

HAMILL, O. *et al.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Arch**, v. 391, p. 85–100, 1981.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clinical Anatomy**, v. 26, n. 1, p. 29–48, 2013.

HEIDEN, M. G. VANDER; DEBERARDINIS, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 657–669, 2017.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**. Sunderland, MA: Sinauer, 2001.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 52, n. 1–2, p. 25–71, 1990.

Instituto Nacional do Câncer. 2017. Mama: Detecção Precoce. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/detecca_o_precoce. Acesso em: 15 jan 2018.

Instituto Nacional do Câncer. **Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

ISOM, L.L. *et al.* Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 433–42, 1995.

JEMAL, A. *et al.* **O Atlas do Câncer**. International Agency for Research in Cancer: second edition, 2014.

JUDÉ, S. *et al.* Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 90, n. 1–3, p. 299–325, 2006.

KALE, V. P.; AMIN, S. G.; PANDEY, M. K. Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2747–2755, 2015.

KIM, D.Y. *et al.* Presenilin/g-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel β 2-subunit regulates cell adhesion and migration. **J Biol Chem**, v. 280, p. 23251–23261, 2005.

KIM, S. New and emerging factors in tumorigenesis: an overview. **Cancer management and research**, v. 15, p. 225–239, 2015.

KING, T. A.; REIS-FILHO, J. S. Lobular neoplasia. **Surg Oncol Clin N Am**, p. 77–86, 2014.

KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 5, p. 325–337, 2011.

KRUGER, L. C.; ISOM, L. L. Voltage-gated Na^+ channels: Not just for conduction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 6, 2016.

KWONG, K.; CARR, M. J. Voltage-gated sodium channels. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 22, p. 131–139, 2015.

LAGO, J. *et al.* Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: Distribution, toxicity, origin and therapeutical uses. **Marine Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6384–6406, 2015.

LANIADO, M.E. *et al.* Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. **Am J Pathol**, v. 150, p. 1213–21, 1997.

LASFARGUES, E.Y.; OZELLO, L. Cultivation of human breast carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, v. 21, p. 1131–1147, 1958.

LEE, A. V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, p. 1–4, 2015.

LEE, S. C.; DEUTSCH, C.; BECK, W. T. Comparison of ion channels in multidrug-resistant and -sensitive human leukemic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 6, p. 2019–2023, 1988.

LIN, W.H. *et al.* Activity-dependent alternative splicing increases persistent sodium current and promotes seizure. **J. Neurosci.**, v. 32, p. 7267–7277, 2012.

LITAN, A.; LANGHANS, S. A. Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, n. March, p. 86, 2015.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAHESWARAN, S.; HABER, D. A. Circulating tumor cells a window into cancer biology and.pdf. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 20, n. 1, p. 96–99, 2010.

MAJEED, W. *et al.* MINI-REVIEW Breast Cancer : Major Risk Factors and Recent Developments in Treatment. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 15, p. 3353–3358, 2014.

MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, n. 1, p. 23–31, 2015.

MARTIN, F. *et al.* Therapeutic value of voltage-gated sodium channel inhibitors in breast, colorectal, and prostate cancer: A systematic review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. NOV, p. 1–11, 2015.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. Treatment of breast cancer. **American Family Physician**, v. 81, n. 11, p. 1339–1346, 2010.

MAVADDAT, N. *et al.* Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **J Natl Cancer Inst.**, v. 105, n. 11, p. 812–22, 2013.

MEDINA, D. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 1, p. 5–19, 1996.

MELZER, C. *et al.* Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.

MELZER, C.; OHE, J. VON DER; HASS, R. Breast Carcinoma: From Initial Tumor Cell Detachment to Settlement at Secondary Sites. **BioMed Research International**, 2017.

MENG, S. Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 24, p. 8152–8162, 2004.

MINN, A.J. *et al.* Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. **J.Clin.Invest.**, v. 115, n. 1, p. 44–55, 2005.

MITCHELL, M. J.; KING, M. R. Computational and Experimental Models of Cancer Cell Response to Fluid Shear Stress. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. March, p. 1–11, 2013.

MOHLER, P.J. *et al.* Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, p. 17533–17538, 2004.

MORAIS-CABRAL, J. H. *et al.* Crystal Structure and Functional Analysis of the HERG Potassium Channel N Terminus: A Eukaryotic PAS Domain. **Cell**, v. 95, n. 5, p. 649–655, 1998.

NAGY, J. A.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 2, n. 1, p. 251–275, 2007.

NAROD, S. A. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5832–5836, 2006.

NELSON, M.; YANG, M.; DOWLE, A. A; *et al.* The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis. **Molecular cancer**, v. 14, p. 13, 2015.

NELSON, M.; YANG, M.; MILLICAN-SLATER, R.; *et al.* Nav 1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32914–32929, 2015.

NIU, N.; WANG, L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. **Pharmacogenomics**, v. 16, p. 273–285, 2015.

NORUM, J. H.; ANDERSEN, K.; SØRLIE, T. Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. **British Journal of Surgery**, v. 101, n. 8, p. 925–938, 2014.

O'MALLEY, H. A.; ISOM, L. L. Sodium channel β subunits: emerging targets in channelopathies. **Annual Review of Physiology**, v. 77, n. 3, p. 481–504, 2016.

ONGANER, P.U.; DJAMGOZ, M.B. Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na(+) channel expression in vitro. **J Membr Biol**, v. 204, p. 67-75, 2005.

ONKAL, R. *et al.* Alternative splicing of Nav1.5: An electrophysiological comparison of “neonatal” and “adult” isoforms and critical involvement of a lysine residue. **Journal of Cellular Physiology**, v. 216, n. 3, p. 716–726, 2008.

ONKAL, R.; DJAMGOZ, M. B. A. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1–3, p. 206–219, 2009.

Organização Mundial da Saúde. 2017. **Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 15 jan 2018.

OSBORNE, C.K.; HOBBS, K.; TRENT, J.M. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. **Breast Cancer Res Treat**, v. 9, n. 2, p. 111–121, 1987.

PANCRAZIO, J. J. *et al.* Voltage-dependent Ion Channels in Small-Cell Lung Cancer Cells. **J. Cancer Research**, v. 49, p. 5901–5906, 1989.

PANDYA, S.; MOORE, R. G. Breast development and anatomy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 54, n. 1, p. 91–95, 2011.

PLUMMER, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 9, p. e609–e616, 2016.

RAKHA, E. A. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era : the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 207, 2010.

RAMON Y CAJAL, S. *et al.* The intra-tumor heterogeneity of cell signaling factors in breast cancer: p4E-BP1 and p1F4E are diffusely expressed and are real potential targets. **Clinical and Translational Oncology**, v. 16, n. 11, p. 937–941, 2014.

RAO, V. R. *et al.* Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. **Cancers**, v. 7, n. 2, p. 849–875, 2015.

RHANA, P. *et al.* Metabolism: A New Frontier in Cancer Research. **J Cancer Prev Curr Res**, v. 8, n. 6, p. 00302, 2017.

ROGER, S. *et al.* Voltage-Gated Sodium Channels : New Targets in Cancer Therapy ? **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 28, p. 3681–3695, 2006.

ROGER, S. *et al.* Voltage-gated sodium channels and cancer: Is excitability their primary role? **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. JUL, p. 1–22, 2015.

ROGER, S. *et al.* Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, p. 774-86, 2007.

ROGER, S.; BESSON, P.; GUENNEC, J. Y. LE. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1616, n. 2, p. 107–111, 2003.

SANTEN, R.J.; MANSEL, R. Benign Breast Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 3, p. 275–285, 2005.

SASLOW, D. *et al.* American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. **CA Cancer J Clin**, v. 57, n. 3, p. 185, 2007.

SCHWAB, A.; STOCK, C. Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1638, p. 20130102–20130102, 2014.

SHIBATA, E.F. *et al.* Autonomic regulation of voltage-gated cardiac ion channels. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.**, v. 17, p. S34–S42, 2006.

Sistema de Informação sobre Mortalidade. **Atlas On-line da Mortalidade**. 2013. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SMITH, P. *et al.* Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. **FEBS Lett**, v. 423, p. 19–24, 1998.

STEWART, B.; WILD, C. **World cancer report 2014**. [s.l: s.n.].

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719–724, 2009.

TONG, X.P. *et al.* Ca(2+) signaling evoked by activation of Na(+) channels and Na(+)/Ca(2+) exchangers is required for GABA-induced NG2 cell migration. **J. Cell Biol.**, v. 186, p. 113–128, 2009.

TRÉDAN, O. *et al.* Angiogenesis and tumor microenvironment: bevacizumab in the breast cancer model. **Targeted Oncology**, v. 10, n. 2, p. 189–198, 2015.

VOUSDEN, K.H.; LANE, D.P. p53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 4, p. 275–83, 2007.

VUONG, D. *et al.* Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1–14, 2014.

WARBURG, O. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–14, 1956.

WEI, C.L. *et al.* A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. **Cell**, v. 124, p. 207, 2006

WILSON, K.; WAUGH, A. **Ross and Wilson Anatomy and Physiology in Health and Illness**. Edinburgh: Elsevier Health Sciences, 2006.

WISEMAN, B.S.; WERB, Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science**, v. 296, p. 1046–1049, 2002.

YAMASHITA, N. *et al.* Enhancement of Voltage-gated Na⁺ Channel Current Associated with Multidrug Resistance in Human Leukemia Cells Enhancement of Voltage-gated Na⁺ Channel Current Associated with Multidrug. **J. Cancer Research**, v. 47, p. 3736–3741, 1987.

YANG, M. *et al.* Therapeutic potential for phenytoin: Targeting Nav1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, n. 2, p. 603–615, 2012.

YAO, L. *et al.* Nav1.5-dependent persistent Na⁺ influx activates CaMKII in rat ventricular myocytes and N1325S mice. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 301, p. C577–C586, 2011.

YU, F.H. *et al.* Sodium channel β 4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to β 2. **J Neurosci**, v. 23, p. 7577–7585, 2003.