

SOFIA DA CONCEIÇÃO FERRAZ MARÇALO

**IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE
CÉLULAS TUMORAIS**

**Orientador Científico
Professor Doutor Nuno Saraiva**

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E
TECNOLOGIAS**

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

LISBOA

2021

SOFIA DA CONCEIÇÃO FERRAZ MARÇALO

**IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE
CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 07/04/2021, perante o júri, nomeado Despacho de Nomeação nº74/2021, de 03/2021 com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Profª. Doutora Ana Sofia Fernandes

Orientador:

Prof. Doutor Nuno Saraiva

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E
TECNOLOGIAS**

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

LISBOA

2021

EPIGRAFE

*“ Viver é como andar de bicicleta. É preciso
estar em constante movimento para
manter o equilíbrio “*

Albert Einsten

DEDICATÓRIA

À memória da minha mãe,
Por ter sido a minha fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, estou eternamente agradecida ao meu pai e à Gena por terem investido na minha formação académica, por todo o apoio, carinho, amor e proteção. Obrigada mãe, pois apesar de longe sei o apoio incondicional que me deste.

Aos meus amigos, principalmente à Sara Ramos e Khatdija Amade, por termos partilhado todas as aventuras e experiências ao longo destes anos todos, sempre com muita motivação, apoio e amizade.

Ao João Miranda, por todo o carinho, compreensão, e ânimo para nunca desistir.

Ao Dr. Joaquim Carrilho, por acreditar sempre em mim e por todo o apoio que me deu.

À Nádia, pelo todo o incentivo, dedicação e apoio.

À minha família, irmão, tias e primo por estarem sempre disponíveis quando mais precisei.

Ao professor Doutor Nuno Saraiva, pelo incansável apoio, pela dedicação, pelo ensinamento e orientação na minha dissertação.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram ao longo deste meu percurso académico, pela ajuda, pelo carinho e pela motivação.

Muito obrigada.

RESUMO

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro essencial e co-factor para proteínas e enzimas, sendo uma das moléculas de sinalização intracelulares mais importantes na regulação da função celular. A regulação dos níveis de Ca^{2+} é conseguida através de um mecanismo complexo que envolve várias vias de sinalização, bem como proteínas reguladas pelo Ca^{2+} intracelular, que controlam processos celulares específicos, incluindo o ciclo celular, proliferação, apoptose, transcrição e migração celular. Deste modo, não é surpreendente que vários tipos de cancros resultem da desregulação da homeostasia deste ião. São inúmeros os canais de Ca^{2+} envolvidos na modelação dos níveis deste ião na membrana citoplasmática e em diversos organelos intracelulares, contidos no retículo endoplasmático, nas mitocôndrias, no complexo de Golgi e nos lisossomas. É importante realçar que a desregulação destes reguladores do fluxo de Ca^{2+} está associada a alterações no comportamento das células tumorais, entre as quais a transição epitelial-mesenquimal, migração celular, invasão local e desenvolvimento tumoral. Neste contexto, o Ca^{2+} é considerada uma ferramenta intracelular fundamental na regulação da dinâmica e complexidade da migração e metastização.

Na presente dissertação, é apresentada e discutida a literatura na vanguarda da sinalização entre organelos de Ca^{2+} no que se refere à migração celular, metástase e progressão do cancro, com foco especial nos canais que regulam o fluxo de Ca^{2+} .

Palavras-Chave: Cálcio; canais de Ca^{2+} ; bombas de Ca^{2+} ; organelos, cancro; migração celular

ABSTRACT

Ca^{2+} is an essential second messenger and cofactor for proteins and enzymes, being one of the most important intracellular signalling molecules in the regulation of cellular function. The regulation of Ca^{2+} levels is achieved through a complex mechanism that involves several signalling pathways, as well as proteins regulated by intracellular Ca^{2+} , which control specific cellular processes, including cell cycle, proliferation, apoptosis, transcription and cell migration. Therefore, it is not surprising that various types of cancers result from the deregulation of this ion's homeostasis. There are several Ca^{2+} channels involved in the modelling of the levels of this ion in the plasma membrane and in several intracellular organelles, namely in the endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi complex and lysosomes. It is important to highlight that the deregulation of these Ca^{2+} flow regulators is associated with changes in the behaviour of tumour cells, within which the epithelial-mesenchymal transition, cell migration, local invasion and tumour development. In this context, Ca^{2+} is considered a fundamental intracellular tool in the regulation of the dynamics and complexity of migration and metastasis.

In this dissertation, the literature is presented and discussed at the forefront of Ca^{2+} between organelles signalling regarding cell migration, metastasis and cancer progression, with a special focus on the channels that regulate Ca^{2+} flow.

Keywords: Calcium; Ca^{2+} channels; Ca^{2+} pumps; organelles; cancer; cell migration

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADPr – adenosina difosfato ribose

ATP – adenosina trifosfato

Ca²⁺ – íão cálcio

CADPR – adenosina difosfato ribose cíclica extracelular

CAK – cinase ativadora de CDK

CAM – calmodulina

CAMK – CAM quinase

CAN – fosfatase dependente de Ca²⁺ ou calcineurina

CaSR – recetor de detecção de cálcio

CDKs – quinase dependente de ciclinas

CRAC – poro condutor de libertação de Ca²⁺ ativado

CT – calcitonina

DAG – diacil-glicerol

DHPR – recetor de diidropiridina

EGF – fator de crescimento epidérmico

GAP – proteína de GTase

GEF – fator de troca de guanina

GPCR – recetor acoplado à proteína G

IP3R – recetor do tipo 1,4,5-trifosfato

LSD – doença de armazenamento lisossomal

MAM – membrana associada às mitocôndrias

MAPK – proteína quinase ativada por proliferação de mitogénio

MC – proteína transmembranar uniporta mitocondrial

MCU – “Mitochondrial calcium uniporter”

MEC – remodelação da matriz extracelular

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

ML-IV – mucopolidose tipo IV

MME – membrana mitocondrial externa

MMPs – metaloproteinases

MOMP – permeabilização de membrana externa mitocondrial

NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAADP – ácido nicotínico adenina fosfatase dinucleotídica

NCLX - “Na⁺/Ca²⁺/Li⁺ exchangers”

NCX – “Na⁺/Ca²⁺ exchangers”

NFATs- fator nuclear de células T ativadas

P2X4 – recetor purinérgico X4

PIP2 – fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PLC – fosfolipase C

PMCA – membrana plasmática de Ca²⁺ ATPase

PMM – permeabilização da membrana mitocondrial

PMPT – poro de transição de permeabilidade mitocondrial

PTH – hormona paratiroideia

RB1 – retinoblastoma

RE – Retículo endoplasmático

REL – RE liso

RER – RE rugoso

ROC – canais operados por recetor

RS – Retículo sarcoendoplasmático

RyR – recetor de rianodina

SERCA – bomba Ca²⁺ ATPase do retículo sarco-endoplasmático

SMOC – mensageiro secundário associado à ativação de GPCR

SOCE – “Store – operated calcium”

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

SPCA – via secretória de transporte de Ca^{2+} ATPase

STIM – via da molécula de interação estromal

TEM – transição epitelial mesenquimal

TFEB – fator de transição EB

TNF- α – fator de necrose tumoral

TRPA1 – recetor potencial transitório de anquirina 1

TRPC1 – potencial do recetor transiente canônico 1

TRPM2 – substituto melastatina 2

TRPV6 – recetor de potencial transitório vanilóide tipo 6

V-ATPase – atividade vacuolar tipo H^+ -ATPase

VDACs – canal aniónico dependente de voltagem

VGCCs – canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo P/Q

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulação sistemática da homeostasia do cálcio	17
Figura 2. Regulação da homeostasia do cálcio pelo recetor de detecção de cálcio (CaSR)	18
Figura 3. Concentração dos diversos organelos intracelulares	20
Figura 4. Dinâmica e homeostase do Ca^{2+} nos diferentes organelos	24
Figura 5. Mecanismo de regulação da entrada e saída de Ca^{2+} na mitocôndria	26
Figura 6. Papel do RS na ligação excitação e contração muscular	32
Figura 7. Entrada de cálcio através da via SOCE	34
Figura 8. Modelo 1 (célula imune) na regulação da via SOCE	35
Figura 9. Modelo 2 (modelo alternativo) na regulação da via SOCE	35
Figura 10. Local de contato do RE para a Mitocôndria	36
Figura 11. Representação do “Mitochondrial Calcium Uniporter” (MCU)	37
Figura 12. Nucleótidos de adenina reguladores intra e extracelulares	38
Figura 13. Libertação de Ca^{2+} induzida por NAADP	39
Figura 14. Canais iónicos e transportadores no endolisossoma	40
Figura 15. A mitocôndria durante o estado estacionário, sobrecarga de Ca^{2+} e célula tumoral	44
Figura 16. Vias de sinalização de Ca^{2+} durante a fase G1	46
Figura 17. Ras durante o ciclo celular	47
Figura 18. PMPT na apoptose	48
Figura 19. Resposta de dano de uma célula saudável e cancerígena	50
Figura 20. Transição Epitelial Mesenquimal	53
Figura 21. Sinalização de cálcio numa célula migratória	55
Figura 22. Complexos de adesão focal na regulação de Ca^{2+}	57

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	14
Capítulo I Homeostasia do Ca²⁺ no Organismo	15
1.REGULAÇÃO DA HOMEOSTASIA DO CÁLCIO NO ORGANISMO	16
Capítulo II Homeostasia do Ca²⁺ nas Células	19
1.REGULAÇÃO DA HOMEOSTASIA DO CÁLCIO NA CÉLULA.....	20
1.1.Regulação do fluxo do cálcio nos organelos celulares	22
1.1.1.Organelos	22
1.1.1.1.Retículo endoplasmático	22
1.1.1.2.Mitocôndrias	24
1.1.1.3.Complexo de golgi.....	27
1.1.1.4.Lisossomas	28
1.2.Os canais transportadores de cálcio.....	30
1.2.1.Recetor de deteção de cálcio	30
1.2.2.SERCA – via Ca²⁺ ATPase reticulares sarcoendoplasmático	31
1.2.3.SOCE – “Store-operated calcium”	33
1.2.4.MCU – “Mitochondrial calcium uniporter”	36
1.2.5.NAADP – Ácido Nicotínico adenina fosfatase dinucleotídica	37
1.2.6.TRPM1	39
1.2.7.SPCA.....	40
1.2.8.TMBIM4	41
Capítulo III Papel do Ca²⁺ nas Células Tumorais.....	42
1.1 DESENVOLVIMENTO TUMORAL PELO IÃO Ca²⁺	43
1.1.1.Papel do Ca²⁺ no desenvolvimento do cancro.....	43
1.1.2.Papel do Ca²⁺ no ciclo celular	45
1.1.3.Papel do Ca²⁺ na regulação de supressores de tumor e oncogenes.....	49
Capítulo IV Papel do Ca²⁺ na Motilidade de Células Tumorais.....	51
1.1. INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS PELO Ca²⁺ ..	52
1.1.1.Indução da motilidade celular pela transição epitelial mesenquimal.....	52
1.1.2.Regulação da TEM via sinalização de Ca²⁺	54

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

1.1.3. Remodelação da matriz extracelular via sinalização de Ca^{2+}	56
1.1.4. Indução de metástases e invasão por meio da sinalização de Ca^{2+}	59
Capítulo V Discussão e Conclusão.....	61
Bibliografia	65

INTRODUÇÃO

O cancro é a segunda causa de morte em todo o mundo, responsável por 9,6 milhões de mortes em 2017, ou seja, cerca de cada 1 em 6 mortes resultam desta patologia. O desenvolvimento do cancro pode iniciar em qualquer tipo de órgão ou tecido, resultando da capacidade das células normais crescerem descontroladamente. Estas células podem adquirir capacidade de migrar para outra região do organismo, processo designado por metastização (Stanaway et al., 2018). Existem inúmeros mecanismos intrínsecos e extrínsecos que levam a processos de metastização no cancro. Ao longo dos últimos anos, tem sido realizado muitos estudos e avanços para o tratamento do cancro, mas a metástase das células torna-se um grande desafio. Exemplo disso é a transição epitelial mesenquimal (TEM), que conduz ao aumento da capacidade de invasão, resistência à terapêutica e à sobrevivência destas células.

Cerca de 90% das mortes responsáveis pelo cancro, são devidas a metástases, sendo neste caso a taxa de sobrevivência baixa (Fares, Fares, Khachfe, Salhab, & Fares, 2020). Durante este processo de metastização, as células invadem os vasos sanguíneos ou linfáticos, conseguindo assim entrar em diferentes órgãos (Mittal, 2018), e também escapar à morte celular programada, proliferando no novo local onde se estabelecem.

Ao longo dos últimos anos, tem vindo a ser estudado a importância e o impacto que o Ca^{2+} tem no desenvolvimento e progressão do cancro. Este ião tem um papel importante em inúmeros fatores envolvidos na homeostasia celular, tais como, o como a proliferação, a migração, a progressão do ciclo celular, a evasão, e o desvio à apoptose, para que não ocorra a tumorigénese (Farfariello, Iamshanova, Germain, Fliniaux, & Prevarskaya, 2014).

Esta dissertação pretende rever alguns dos canais envolvidos na homeostasia do Ca^{2+} em diferentes organelos intracelulares em células normais e células tumorais, dando relevância no impacto destes canais na regulação da TEM e na motilidade das células tumorais.

Capítulo I

Homeostasia do Ca^{2+} no Organismo

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

1. REGULAÇÃO DA HOMEOSTASIA DO CÁLCIO NO ORGANISMO

A homeostasia do catião bivalente de cálcio (Ca^{2+}) consiste numa regulação continua da concentração de Ca^{2+} de modo a conseguir manter a fisiologia e metabolismo em equilíbrio (Biswal, Sen, & Maka, 2019). O Ca^{2+} é o terceiro metal mais abundante na Terra e está envolvido na regulação de vários processos biológicos, dentro dos quais, contração muscular, resposta imune, ativação enzimática, expressão génica, indução da plasticidade sináptica, diferenciação celular e morte celular (Carafoli & Krebs, 2016). Os primeiros estudos relacionados com a função do Ca^{2+} na regulação de processos fisiológicos iniciaram-se com o estudo do papel deste na contração do músculo cardíaco, nos ratinhos (M. M. Xu, Seas, Kiyani, Ji, & Bell, 2018). O estudo do papel do cálcio continuou a ser aprofundado em vários outros processos fisiológicos, tais como a contração muscular e a transmissão neuronal (M. M. Xu et al., 2018). Para que estes processos sejam eficientes é importante que a concentração de cálcio no organismo, tanto nos compartimentos intra- como extracelulares, permaneça em constante equilíbrio.

A homeostasia do Ca^{2+} envolve vários sistemas, dentro dos quais os ossos, os rins e o intestino (Pu, Chen, & Xue, 2016), e ainda três hormonas, a calcitonina, a vitamina D e a hormona paratiroideia (PTH) (Figura 1). Os ossos têm uma função importante na regulação dos níveis de Ca^{2+} no sangue, para que as funções como a contração muscular e os potenciais de membrana ocorram regularmente. Se ocorrer algum distúrbio podem perturbar o processo normal de remodelação óssea, causando várias doenças, como a osteoporose, além de causar outras anomalias e condições patológicas (Biswal et al., 2019). Os rins também desempenha um papel fundamental na regulação do Ca^{2+} , participando na eliminação deste ião no organismo. Esta absorção e deteção por este órgão é realizada no nefrónio, particularmente nos túbulos proximais. Por fim, os ossos não alteram o balanço corporal total do cálcio mas alteram a distribuição de cálcio dentro do corpo humano (Widmaier, Raff & Strang, 2006, p. 526). O intestino participa na absorção, reabsorção e eliminação do Ca^{2+} . A absorção de Ca^{2+} é realizada no duodeno (aproximadamente 80%), sendo que este processo é feito através de duas vias, o transporte paracelular e absorção transcelular. Na absorção paracelular, estão envolvidos o TRPV6 (recetor de potencial transitório vanilóide tipo 6), as proteínas calbindina D9K e PMCA1b (membrana plasmática de Ca^{2+} ATPase), sendo que este

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

mecanismo requer energia para que ocorra. Por outro lado, o transporte paracelular não requer energia e pode ser observado por todo o intestino.

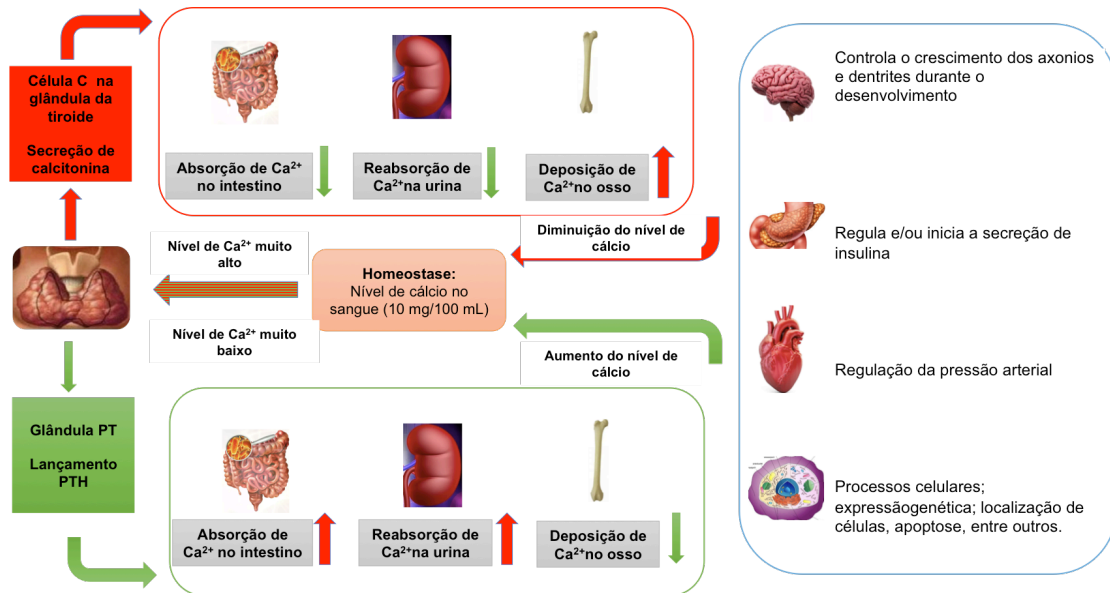


Figura 1. Regulação sistêmica da homeostasia do cálcio.

Os níveis de cálcio nos fluidos corporais são controlados por um sistema de controlo retroativo, por regulação de funções celulares e de alguns tecidos. Se a concentração de Ca²⁺ permanecer baixa, a PTH é libertada pelas glândulas paratiroideias, e consequentemente o Ca²⁺ vai ser absorvido pelos intestinos, rins e osso, mas se a concentração de Ca²⁺ permanecer alta, a regulação vai ser o oposto para controlar os níveis de Ca²⁺ no sangue. Este sistema inclui o transporte de cálcio nos intestinos, rim e osso que são regulados por algumas hormonas, como a hormona paratiroideia (PTH), a calcitonina (CT) e 1,25 – di – hidroxivitamina D3 (adaptado de (C. Zhang, Miller, Brown, & Yang, 2015).

O recetor de deteção de cálcio (CaSR) desempenha uma função importante na manutenção do equilíbrio da ingestão e da absorção do Ca²⁺ na formação de osso, a excreção a nível renal e no trato gastrointestinal. Nas glândulas paratiroideias, há produção da hormona paratiroideia, também com o objetivo de regular os níveis de cálcio, pois se havendo um excesso deste no sangue, a produção desta hormona é impedida porque a sinalização de CaSR bloqueia o crescimento e proliferação das células paratiroideias (Figura 2) (Pu et al., 2016). Nas células renais, o CaSR também bloqueia a reabsorção de cálcio nos túbulos filtrados quando este está em excesso (Genetic Home Reference, 2018).

Além destes processos fisiológicos mencionados, a desregulação do cálcio também conduz a diversas alterações no comportamento celular, incluindo a proliferação celular, angiogénese, alterações da apoptose, diferenciação, metabolismo,

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

transcrição génica e mutações que podem conduzir à formação de tumores (Zhong, Pan, Wang, Yang, & Ding, 2019).

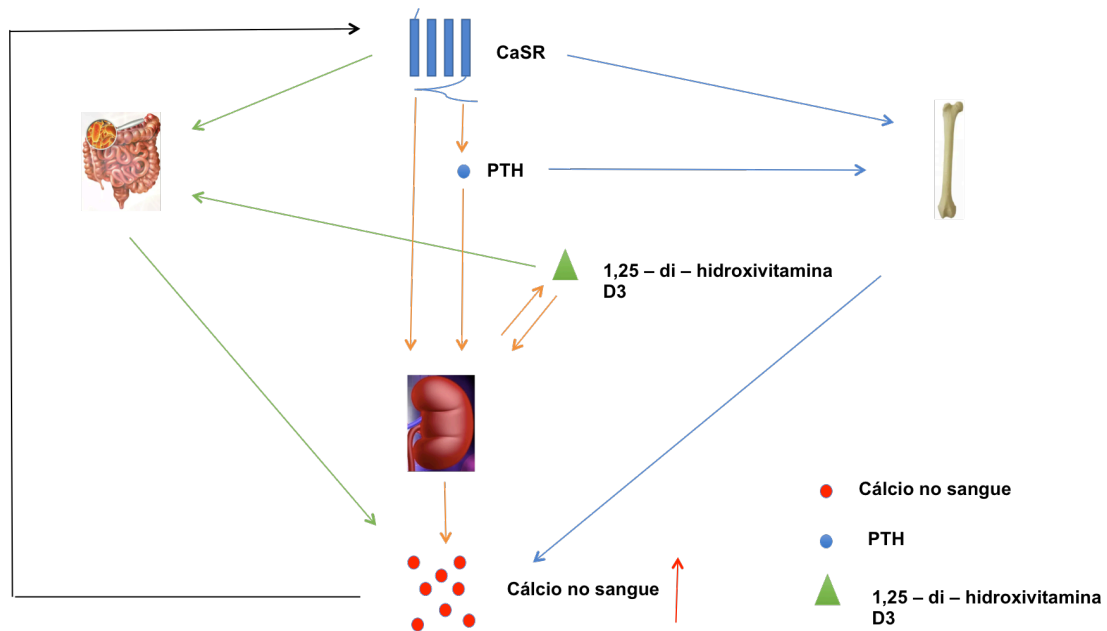


Figura 2. Regulação da homeostasia do cálcio pelo recetor de deteção de cálcio (CaSR)

Quando os níveis de cálcio no sangue diminuem, o CaSR vai ser ativado através da glândula paratiroideia, e sem seguida a secreção da PTH. A PTH aumenta os níveis de cálcio nos rins e no osso e também leva à produção e secreção de 1,25 – di – hidroxitamina D3 em células do rim (adaptado de (Pu et al., 2016).

Capítulo II

Homeostasia do Ca^{2+} nas Células

1. REGULAÇÃO DA HOMEOSTASIA DO CÁLCIO NA CÉLULA

O Ca^{2+} é uma das moléculas de sinalização intracelulares mais importantes no controlo da localização do cálcio e na manutenção do seu rácio no meio intracelular e extracelular (H. Xu & Ren, 2017). A concentração intracelular de Ca^{2+} livre varia muito no que concerne à sua localização. Em condições de repouso, o Ca^{2+} apresenta uma concentração 104 vezes superior no meio extracelular comparativamente com a sua concentração no meio intracelular (citoplasma) (Figura 3) (H. Xu & Ren, 2017). No interior das células, os níveis deste catião nas matrizes nucleares e mitocondriais são semelhantes aos encontrados no citoplasma. Contudo, existem alguns organelos, tais como o retículo endoplasmático e os lisossomas que podem acumular e manter os seus níveis de Ca^{2+} mais elevados que o citoplasma (H. Xu & Ren, 2017). A regulação dos níveis de cálcio é conseguida através de um mecanismo complexo que envolve várias vias de sinalização, bem como proteínas reguladas pelo Ca^{2+} intracelular, que controlam processos celulares específicos, incluindo o ciclo celular, proliferação, apoptose, transcrição e migração celular (Berridge, Bootman, & Roderick, 2003). A desregulação da sinalização do Ca^{2+} está associada a consequências desastrosas a nível fisiológico e patológico. Particularmente, a desregulação das vias de sinalização mediadas pelo Ca^{2+} estão envolvidas em processos de desenvolvimento tumoral e da sua progressão (M. M. Xu et al., 2018; Zhong et al., 2019).

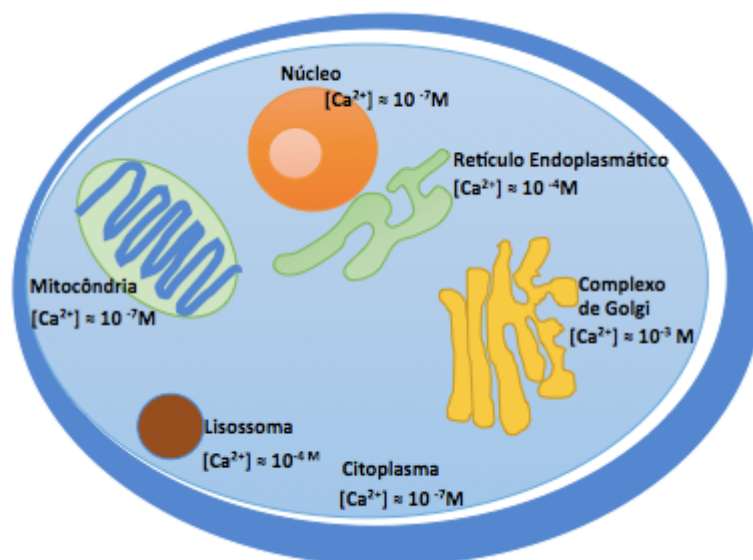


Figura 3. Concentrações dos diversos organelos intracelulares

A concentração de Ca^{2+} no núcleo e no citoplasma é de 10^{-7} M, enquanto que nos restantes organelos intracelulares, as concentrações de Ca^{2+} são: mitocôndria (10^{-7} M); lisossoma (10^{-4} M); complexo de Golgi (10^{-3} M); e retículo endoplasmático (10^{-4} M).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

Diferentes estímulos celulares, nomeadamente a depolarização de membrana, mensageiros intracelulares e moléculas de sinalização extracelular, são capazes de regular o fluxo de cálcio entre o meio intracelular e extracelular. A entrada de Ca^{2+} na célula é efetivada através canais de cálcio presentes na membrana plasmática, já a libertação do mesmo dos compartimentos intracelulares é efetuada, por exemplo, através dos recetores do tipo 1,4,5-trifosfato (IP3R) e rianodina (RyR) (H. Xu & Ren, 2017).

Os canais de cálcio têm um papel fundamental na modelação dos níveis de cálcio na célula. Estes podem ser divididos em dois grupos: (a) os canais dependentes de voltagem e (b) os canais não dependentes de voltagem (Zhong et al., 2019). Os canais de cálcio dependentes de voltagem incluem cinco tipos de canais de cálcio distintos, o tipo L-, P-, N-, R- e T. As células que apresentam este tipo de canais necessitam que ocorram uma despolarização de membrana para que estes sejam ativados (Zeilhofer, 2007). Por outro lado, os canais não dependentes de voltagem estão relacionados com a entrada de Ca^{2+} não dependente da excitação celular e podem ser divididos em diferentes categorias: canais bloqueados por ligando (que incluem os recetores ionotrópicos purinérgicos P2X), canais operados por recetor (ROC) ou canais operados por mensageiro secundário associado à ativação de GPCR (SMOC), “store – operated calcium” (como os SOCs), e canais operados por estiramento (nomeadamente os membros da família de canais TRP (J. M. Lee, Davis, Roberts-Thomson, & Monteith, 2011). Além disso, a proteína “mitochondrial calcium uniporter” (MCU) é capaz de regular a captação de Ca^{2+} nas mitocôndrias (De Stefani, Patron, & Rizzuto, 2014).

A modelação dos níveis de Ca^{2+} nos vários compartimentos celulares, juntamente com alterações nos padrões de sinalização do Ca^{2+} intracelular, pode conduzir a alterações no destino celular através da transformação funcional de múltiplos efetores dependentes de Ca^{2+} envolvidos nas principais vias de sinalização intracelulares (Prevarskaya, Skryma, & Shuba, 2013) (J. M. Lee et al., 2011) (Zhong et al., 2019).

1.1. Regulação do fluxo do cálcio nos organelos celulares

1.1.1. Organelos

Os principais organelos envolvidos na regulação da homeostasia do cálcio intracelular, são o Retículo Endoplasmático / Sarcoplasmático, as Mitocôndrias, o Complexo de Golgi e os Lisossomas.

1.1.1.1. Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é um extenso conjunto membranar em forma de rede que muitas vezes ocupa grande parte do interior das células (Gray, 2013) (Schwarz & Blower, 2016). Este organelo é responsável por múltiplas funções celulares, dentro das quais a síntese e processamento de proteínas, síntese de lipídios, suporte da excitação-contração do músculo (retículo sarcoplasmático, RS) e armazenamento e libertação de Ca^{2+} (Gray, 2013; Schwarz & Blower, 2016). O RE está ligado à membrana celular e nuclear e organiza-se em duas zonas principais: a lisa e a rugosa. O RE liso (REL) participa na síntese de lipídios, já o RE rugoso (RER) participa no processamento de proteínas (Schwarz & Blower, 2016).

O RE é o maior depósito de cálcio nas células animais e desempenha um papel central na sinalização deste íão (Gray, 2013). A concentração deste íão no lúmen do RE é de aproximadamente 10^{-4} M, contrastando com a concentração deste no citoplasma (10^{-7} M). A libertação rápida de cálcio do RE ou do RS conduz a um aumento de Ca^{2+} no citoplasma que controla diversas funções da célula. Esta libertação é regulada através dos vários canais de cálcio, nomeadamente o recetor inositol 1,4,5-trifosfato (recetor IP3) e o recetor de rianodina (RyR) (Berridge, 2009). Este mecanismo de libertação de Ca^{2+} tem início com a estimulação da fosfolipase C (PLC) pelo recetor acoplado à proteína G (GPCR) (Marcello & White, 2010). A PLC, uma vez ativada, cliva o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) em diacil-glicerol (DAG) e IP3, que se liga ao recetor IP3 e promove a libertação de Ca^{2+} (Berridge, 2005). A despolarização das membranas do túbulo T também têm um papel importante na libertação do Ca^{2+} . A sua despolarização pode conduzir a alterações conformacionais nos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, tais como os recetores de diidropiridina (DHPRs), que ativam os RyRs conduzindo à libertação de Ca^{2+} (Cicek, Ozgur, Ozgur, & Ugur, 2014). Esta redução dos níveis de Ca^{2+} no lúmen do RE ativa a via da molécula de interação estromal (STIM), conduzindo à entrada

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

de Ca^{2+} via membrana celular através dos canais Orais (Shim, Tirado-Lee, & Prakriya, 2015). As bombas Ca^{2+} ATPase do retículo sarco-endoplasmático (SERCA) também têm um papel fundamental no influxo de Ca^{2+} no RS/RE. As SERCA podem ser encontradas na membrana do RE estando dependentes da hidrólise de ATP para seu funcionamento (Bublitz et al., 2013; Wuytack, Raeymaekers, & Missiaen, 2002). A atividade destas bombas é fundamental para a manutenção do Ca^{2+} livre no lúmen do RE em repouso, sendo estes níveis essenciais para a modulação de IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) e expressão de SERCA (Chami et al., 2001).

Existe outra membrana que englobada o RE e as mitocôndrias, a MAM (membrana associada às mitocôndrias) que é também responsável pelo efluxo de Ca^{2+} , associada aos locais de contacto membranar que envolvem o IP3R localizado no RE e o canal aniónico dependente de voltagem (VDACs) localizada na membrana mitocondrial externa (MME). Quando há uma estimulação do recetor IP3, o Ca^{2+} é libertado do RE para a MAM, sendo que o Ca^{2+} entra nos VDACs da MME, para o espaço intermembranar das mitocôndrias, facilitando o influxo de Ca^{2+} e consequentemente a sua absorção pela mitocôndria (Rossini, Pizzo, & Filadi, 2020). Os níveis de Ca^{2+} não são regulados exclusivamente pelo RE, o aparelho de Golgi, as mitocôndrias e os lisossomas têm também um papel importante nesta regulação (Figura 4). Existe mesmo uma rede de sinalização de Ca^{2+} que liga estes organelos que coordena a entrada e saída de Ca^{2+} da célula ativando múltiplas vias de sinalização (Prins & Michalak, 2011).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

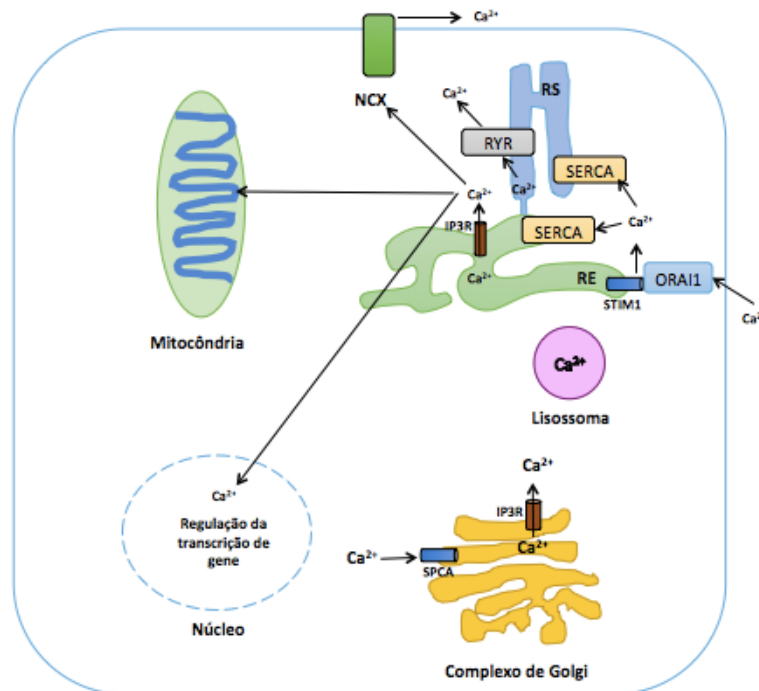


Figura 4. Dinâmica e homeostase do Ca^{2+} nos diferentes organelos.

O Ca^{2+} é armazenado em vários organelos diferentes, incluindo o RE, complexo de Golgi, mitocôndrias e lisossomas. No RE, existe um ligante extracelular, que após um estímulo, leva à ativação de IP3, que se liga em seguida ao IP3R, libertando assim o Ca^{2+} do RE. Este Ca^{2+} libertado também vai ser intercetado pelas mitocôndrias, e pelos “ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers” (NCX). Quando há redução de Ca^{2+} no RE, existe um sensor o STIM1, que oligomeriza e comunica com o Orai1. Este Orai1 vai possibilitar a entrada de Ca^{2+} para o citoplasma, onde o SERCA vai captar esse Ca^{2+} . No complexo de Golgi, existe também o IP3R, capaz de libertar Ca^{2+} através deste recetor. Por outro lado, o Ca^{2+} entra no complexo de Golgi através da via SPCA (via secretória de transporte de Ca^{2+} ATPase). Os lisossomas são organelos de armazenamento de Ca^{2+} (adaptado de (Prins & Michalak, 2011)).

1.1.1.2. Mitocôndrias

As mitocôndrias são pequenos organelos celulares de forma arredondada ou alongada cuja função principal é a produção de energia (sob a forma de ATP) (Grevel, Grevel, Becker, & Becker, 2020). Estes organelos são delimitados por duas membranas compostas por lípidos e proteínas semelhantes às demais membranas celulares. A membrana externa das mitocôndrias é lisa, já a membrana interna é composta por múltiplas pregas, denominadas cristas mitocondriais, que se projetam para o seu interior (Grevel et al., 2020). Na cavidade interna das mitocôndrias, está localizado a matriz mitocondrial, um fluido com diversas enzimas, juntamente com DNA, RNA, pequenos ribossomas e substâncias necessárias à produção de certas proteínas. As mitocôndrias têm o seu próprio genoma, o que reflete a sua

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

origem evolutiva bacteriana. Deste modo, apesar da maioria das proteínas mitocondriais serem codificadas por genes nucleares, determinadas proteínas respiratórias e tRNAs das mitocôndrias são codificados pelo genoma mitocondrial (Huabo Wang, Ramakrishnan, Fletcher, Prochownik, & Genetics, 2014).

Sendo uma das principais funções das mitocôndrias a produção de energia para as células, estas desempenham um papel importante na regulação da síntese de fosfolipídios e heme, na ativação da apoptose/ morte celular e na homeostasia do cálcio (Duchen, 2000) (Understanding, Harvard, Susin, Lorenzo, & Zamzami, 1999). O complexo MCU, localizado na membrana interna mitocondrial, é o principal responsável pela captação de Ca^{2+} para a matriz mitocondrial, que é estimulada pelo potencial da membrana mitocondrial interna. Desta forma, o fluxo de cálcio para o interior da mitocôndria é regulado por múltiplos fatores que controlam os níveis da energia nas mitocôndrias, tais como os inibidores e os dissociadores da cadeia respiratória (Bravo-Sagua et al., 2017) (Rossi, Pizzo, & Filadi, 2019).

O influxo e efluxo de Ca^{2+} nas mitocôndrias é um processo dinâmico que requer equilíbrio, sendo que a entrada de Ca^{2+} é compensado pela saída de outros iões e preservado pelo circuito de prótons na membrana interna mitocondrial (H. Xu & Ren, 2017). A acumulação de Ca^{2+} na mitocôndria é conseguido por proteínas, nucleótidos e fosfatos que têm afinidade para estes iões e que permitem a queletação de Ca^{2+} na matriz mitocondrial. No citoplasma quando a concentração de Ca^{2+} é basal, o Ca^{2+} acumulado na mitocôndria é rapidamente libertado, elevando a concentração de Ca^{2+} no citoplasma. Um pequeno aumento na concentração de Ca^{2+} mitocondrial ativa a piruvato desidrogenase, a isocitrato desidrogenase e a oxaloacetato desidrogenase, estimulando o metabolismo mitocondrial. Em contrapartida, a acumulação de elevados níveis de Ca^{2+} pela mitocôndria conduz à ativação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PMPT) (Figura 5), que compromete a viabilidade da mitocôndria e a sobrevivência da célula. Contudo, na presença de cálcio em excesso, este canal pode permitir o efluxo de cálcio, diminuindo o risco dos danos nestes organelos e a dissipação do potencial de membrana, impedindo assim a morte celular (Dykens & Will, 2007). O recetor de rianodina (RyR), que se encontra na membrana interna das mitocôndrias permite a entrada de Ca^{2+} como resultado de elevados níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} . Esta capacidade de influxo de cálcio por RyR foi ainda comprovada por estudos relativos a um inibidor de RyR, que bloqueia o influxo de Ca^{2+} na mitocôndria (Díaz-Vegas et al., 2018).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

A desregulação dos níveis de Ca^{2+} nas mitocôndrias está associado a diversas patologias. A diminuição do cálcio na matriz mitocondrial como resultado do efluxo do cálcio através do “ $\text{Na}^+/\text{Ca}^+/\text{Li}^+$ exchanger” (NCLX) está associado à insuficiência cardíaca. Este facto é comprovado pela inibição do NCLX que se revelou benéfica em modelos de cobaias para insuficiência cardíaca (González-Sánchez, Satrústegui, Palau, & Del Arco, 2019; Gurung et al., 2011). Por outro lado, o aumento de cálcio mitocondrial compromete a integridade celular em várias fisiopatológicas, como é o caso dos acidentes vasculares cerebrais, condições inflamatórias do fígado e doença cardíaca isquémica (Archer, 2013). A sinalização do Ca^{2+} nas mitocôndrias é também muito importante na modificação de alteração maligna de uma célula, sendo modificada múltiplas vezes (Morciano et al., 2018). Particularmente, o influxo de Ca^{2+} nas mitocôndrias pelo MCU é determinante para o crescimento tumoral e migração destas células. Como demonstrado por Tosatto et al. (2016), em linhas celulares de cancro da mama, a redução de MCU afeta a metastização e progressão do tumor (Tosatto et al., 2016).

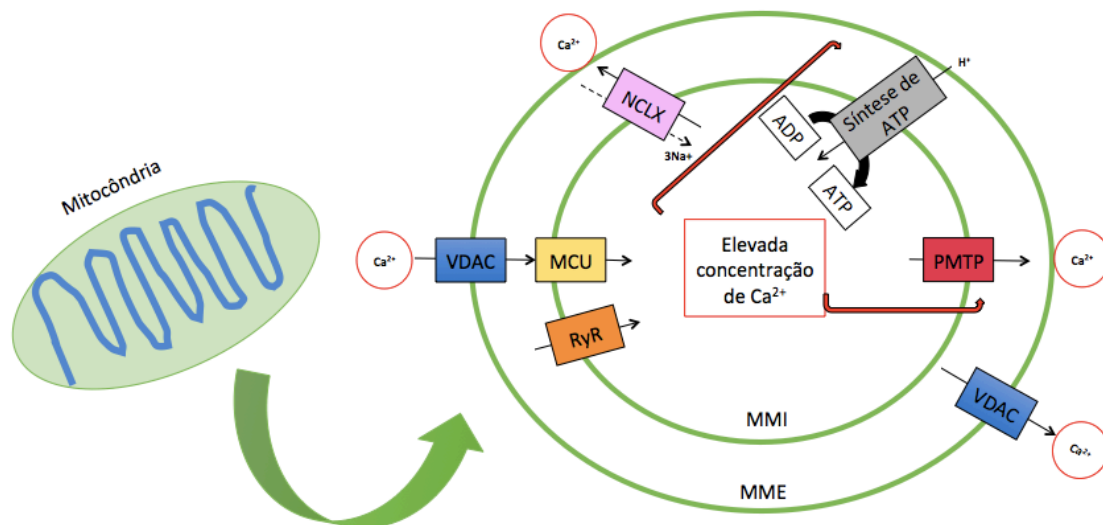


Figura 5. Mecanismo de regulação da entrada e saída de Ca^{2+} na mitocôndria

Como podemos identificar na Figura, o influxo de Ca^{2+} na mitocôndria acontece através do complexo “mitochondrial calcium uniporter” (MCU) e através do receptor de rianodina (RyR1). O efluxo de Ca^{2+} também pode ser demonstrado através do “ $\text{Na}^+/\text{Ca}^+/\text{Li}^+$ exchanger” (NCLX). O canal aniónico dependente de voltagem (VDACs) – que vai ser referido posteriormente – fornece um percurso para o Ca^{2+} entrar na mitocôndria e transporta metabólitos pela membrana mitocondrial externa (MME). Se os níveis de Ca^{2+} permanecerem em excesso, pode ser ativado o poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PMTP) e conseqüentemente a morte celular (adaptado de (Finkel et al., 2018; Ryu, Beutner, Dirksen, Kinnally, & Sheu, 2011).

1.1.1.3. Complexo de golgi

O complexo de Golgi é um organelo muito dinâmico que participa em diversos processos como, a maturação pós-transdução de proteínas, a biogénese e a recuperação de proteínas, o tráfico e a segregação de produtos de secreção, a maturação de hormonas, a biogénese de lisossomas, entre outros (Li, Ahat, & Wang, 2019). Este organelo é constituído por pilhas de sacos achatados revestidos por uma membrana simples, conhecidos por cisternas, que modificam e empacotam moléculas produzidas no RE que têm como destino outros compartimentos celulares ou a secreção. Em cada complexo de Golgi podemos distinguir duas faces de estruturas tubulares e de cisternas: a rede cis de Golgi (CGN, Cis Golgi Network) e a rede trans de Golgi (TGN, Trans Golgi Network). A face cis, voltada para o RE recebe vesículas provenientes deste organelo como proteínas e lípidos com destino ao processamento, por outro lado, a face trans encontra-se associado a vesículas secretoras com destino à superfície celular ou a outros compartimentos. As redes cis e trans são bioquimicamente distintas, no que concerne ao seu conteúdo e às suas membranas, o que reforça esta polaridade morfológica.

A estrutura e função do complexo de Golgi é regulada pelo Ca^{2+} que podemos encontrar no seu depósito (Pinton, Pozzan, & Rizzuto, 1998). A concentração de cálcio no Golgi é de aproximadamente 0,3 mM nas células não estimuladas, sendo que a concentração no citoplasma é mais baixa. Por outro lado, o aumento localizado da concentração de Ca^{2+} no citoplasma como resultado da libertação deste por parte do complexo de Golgi parece estar associado ao controlo da fusão vesicular e ao transporte de vesículas (Micaroni et al., 2010).

Os níveis de Ca^{2+} no complexo de Golgi são regulados pela via secretória de transporte de Ca^{2+} ATPase-1 (SPCA1) e bomba de Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA). Mutações no gene 1 estão associadas à doença de Hailey-Hailey, uma condição genética rara, que se caracteriza por lesões vesiculares e erosões, associadas a dor e ardor, destacando assim o papel crítico do complexo de Golgi na homeostasia celular do cálcio. Também a sensibilidade das células da pele em consequência do incorreto funcionamento de SPCA1 parece estar associado à regulação dos níveis de Ca^{2+} por este em queratinócitos.

Outras proteínas que desempenham um papel fundamental na regulação dos níveis de Ca^{2+} do complexo de Golgi são a CALNUC, a Cab45 e a P54/ NEFA, que aumentam a capacidade de armazenamento de Ca^{2+} neste organelo. Os recetores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) são também capazes de mediar o fluxo de Ca^{2+}

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

neste organelo pela ativação de canais no mesmo, promovendo a libertação de Ca^{2+} (Dolman & Tepikin, 2006). Existe mesmo um estudo que demonstra que o IP_3 não liberta Ca^{2+} do complexo de Golgi mesmo contendo SPCA1 (Vanoevelen et al., 2004). A proteína antiapoptótica do Golgi (GAAP) ou proteína de motivo 4 contendo o inibidor transmembranar Bax (TMBIM4) também é um importante regulador do fluxo de Ca^{2+} no complexo de Golgi. A sobreexpressão desta proteína promove a entrada de cálcio nas células o que leva a uma crescente ativação da proteína calpaína 2 junto à membrana plasmática. A calpaína 2 ativa promove o aumento das aderências focais, estimulando a migração celular, adesão e fenótipos de propagação (Takasuga & Sasaki, 2008). Por outro lado, as mutações dos resíduos de Glu-207 ou -178 diminuem os efeitos de GAAP na migração e adesão celular (Carrara et al., 2015). O decréscimo endógeno de GAAP promove a alongação celular e as fibras de actina em stress concentram-se na periferia das células, muito diferente do que acontece em células controlo, onde estas se dispõem mais no centro das células (Takasuga & Sasaki, 2008). Os efeitos do GAAP na migração, adesão e disseminação celular são consistentes com o facto de GAAP ser um canal seletivo de cationes (Carrara, Parsons, Saraiva, & Smith, 2017; Saraiva et al., 2013; Yonashiro et al., 2009)(Carrara et al., 2017; Saraiva et al., 2013).

1.1.1.4. Lisossomas

Os lisossomas são organelos citoplasmáticos esféricos delimitados por uma membrana lipoproteica (Saftig & Klumperman, 2009; H. Xu & Ren, 2017). Estes organelos têm origem na fase de maturação do complexo de Golgi e desempenham um papel fundamental na digestão intracelular, por fagocitose ou pinocitose quando digere substâncias vindas do meio extracelular (heterofagia) ou através da formação de vacúolos autofágicos que permitem a digestão de organelos que requerem uma renovação no interior da célula (autofagia) e por isso são conhecidos como “centros de reciclagem” (J. Yang, Zhao, Gu, Feng, & Xu, 2019). Contêm diversas enzimas hidrolases, tais como peptidases, nucleases e lípases, que atuam como agentes degradativos de um grande número de produtos. Estas hidrolases requerem um ambiente ácido para a sua atuação e a digestão ocorre no interior dos lisossomas de forma a não danificar a célula. A concentração de Ca^{2+} nos lisossomas é de aproximadamente 0,4 – 0,6 mmol/L. A regulação do seu fluxo é conseguida através de canais iónicos e transportadores nas membranas dos lisossomas (J. Yang et al., 2019).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

Os canais TRPML são canais de catiões permeáveis ao Ca^{2+} que estão presentes nas membranas dos lisossomas (Grimm, Butz, Chen, Wahl-Schott, & Biel, 2017; Xiong & X. Zhu, 2016). Existem três tipos de canais TRPML: o TRPML1, o TRPML2 e o TRPML3 ou MCOLN1–3 (Xiping Cheng, Dongbiao Shen, Mohammad Samie, 2010). O fluxo de Ca^{2+} mediado pelos canais TRPML está envolvido numa variedade de processos biológicos celulares básicos, nomeadamente a autofagia e exocitose lisossomal ou até mesmo no reparo da membrana (Grimm et al., 2017; Xiong & X. Zhu, 2016). O canal TRPML1 pode ser ativado diretamente por espécies reativas de oxigénio, levando à libertação de Ca^{2+} , à biogénese e autofagia dependente de Ca^{2+} (X. Zhang, Yu, & Xu, 2016). Os canais de Na^+ e K^+ que regulam o potencial de membrana do lisossoma são também capazes de modular a libertação de Ca^{2+} de TRPML1, contribuindo deste modo para a complexa regulação do fluxo de Ca^{2+} nos lisossomas (W. Wang et al., 2017; Xiong & X. Zhu, 2016). A perda de função do canal iónico do tipo TRPML1 causa uma doença de armazenamento lisossomal (LSD), a mucopolidose tipo IV (ML-IV).

Nas membranas dos lisossomas podemos também encontrar os canais TPC1 e TPC2 (X. Hao et al., 2009). A sobreexpressão de TPC promove a libertação de Ca^{2+} lisossomal (Grimm et al., 2017; Pitt et al., 2010), desempenhando um papel importante na regulação do Ca^{2+} nestes organelos. O NAADP é um mensageiro que desempenha um papel de relevo também na mobilização do Ca^{2+} lisossomal, sendo os recetores TPCs os candidatos mais promissores para regulação via NAADP (Grimm et al., 2017; Pitt et al., 2010). O fosfoinosítideo, $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$, é também capaz de regular os recetores TPC do lisossoma, permitindo a regulação dos níveis de cálcio (Höglinger et al., 2015).

Um outro canal presente nas membranas lisossomais é o P2X4 (recetor purinérgico X4). Este canal catiónico pode ser ativado por ATP luminal e alcalinização (P. Huang et al., 2014; Qureshi, Paramasivam, Yu, & Murrell-Lagnado, 2007) e permite a libertação de Ca^{2+} recorrendo a um mecanismo em que ocorre a fusão da membrana lisossomal dependente de calmodulina (Cao et al., 2015). Outro canal catiónico encontrado nas membranas lisossomais é o TRPA1 (recetor potencial transitório de anquirina 1), sendo importante na mediação da exocitose das células neuronais (Shang et al., 2016). Nas células pancreáticas, células imunológicas e neurónios podemos ainda encontrar outro canal catiónico, o TRPM2, um canal seletivo, mas permeável ao Ca^{2+} , sendo regulado via ADP-ribose (Lange et al., 2009). Nos neurónios do sistema nervoso central, podemos ainda encontrar os canais de Ca^{2+}

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

dependentes de voltagem do tipo P/Q (VGCCs), codificados por *CACNA1*. Estes medeiam a entrada de Ca^{2+} , desencadeando a libertação de neurotransmissores (Tian et al., 2015).

A desregulação do fluxo de cálcio nos lisossomas pode conduzir a consequências desastrosas na homeostasia celular. O fator de transcrição EB (TFEB), o principal regulador da biogénese lisossomal e responsável pela transcrição de genes pertencentes à rede de expressão e regulação lisossomal coordenada está intimamente ligado à sinalização de Ca^{2+} por meio do canal TRPML1. Quando o lisossoma está sujeito a stress, os canais TRPML1 libertam cálcio para o citoplasma, criando um microambiente enriquecido com cálcio no qual a calcineurina é ativada promovendo a desfosforilação do TFEB, o que conduz à sua dissociação e subsequente translocação nuclear (Medina & Ballabio, 2015; Medina et al., 2015). Por outro lado, recentemente, foi demonstrado que a depleção genética do recetor TRPML1 conduz à diminuição da sobrevivência celular e que a sinalização via TRPML1 e mTORC1 são fundamentais para a progressão de células cancerosas mais agressivas (Jung et al., 2019; Jung & Venkatachalam, 2019; M. Xu et al., 2019). Noutros estudos verificou-se que os níveis de mRNA e proteína de TRPML2 aumentam com o grau patológico de glioma (Morelli et al., 2016). Deste modo a desregulação dos canais de Ca^{2+} dos lisossomas podem afetar o normal funcionamento dos lisossomas, promovendo a invasão tumoral e a metastização através da regulação da homeostasia do Ca^{2+} lisossomal.

1.2. Os canais transportadores de cálcio

Como já foi mencionado são múltiplos os recetores de cálcio responsáveis pela sua regulação de cálcio. Agora vai ser mencionado como eles atuam nas células, como o recetor de deteção de cálcio, o SERCA, o SOCE, o MCU, o NAADP, o TRML, o SPCA, e o CALNUC.

1.2.1. Recetor de deteção de cálcio

O recetor de deteção de cálcio (CaSR) é um dos mais importantes reguladores deste ião e é principalmente expresso nas glândulas paratiróides e nos túbulos renais dos rins. O CaSR é um recetor acoplado à proteína G (GPCR) e tem diversas funções importantes a nível celular, como a regulação da expressão génica,

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

proliferação celular, diferenciação e morte celular (Tennakoon, Aggarwal, & Kállay, 2016).

O íon cálcio liga-se ao CaSR, regulando o influxo deste no sangue. O aumento da concentração de Ca^{2+} conduz à ativação do recetor CaSR de forma a permitir a manutenção e o equilíbrio dos níveis de cálcio no sangue (Genetic Home Reference, 2018).

O CaSR é ativado por uma afinidade de ligandos, dentro dos quais os ligandos do tipo I e do tipo II. Os ligandos tipo I estimulam de modo direto o recetor CaSR enquanto que os ligandos do tipo II modelam o recetor de forma a sensibiliza-lo para ligandos do tipo II. A ligação do ligando ao recetor CaSR conduz a uma alteração na conformação do último levando a uma sinalização específica desse ligando. O pH, a força iónica e as condições fisiológicas, afetam também a atividade do CaSR. Os moduladores farmacológicos, como os calcimiméticos e calcilíticos, também podem influenciar a expressão do CaSR. Os calcimiméticos aumentam a sensibilidade do CaSR ao cálcio e os calcilíticos diminuem esta sensibilidade (Tennakoon et al., 2016). A alteração da expressão e a desregulação deste recetor está relacionada com a progressão de diferentes tipos de cancro. Particularmente, a ativação de CaSR facilita a metastização óssea com origem em cancros da mama e da próstata. Por outro lado, a inibição da expressão de CaSR está associada a cancros da paratireóide e do cólon (Breuksch, Weinert, & Brenner, 2016).

1.2.2. SERCA – via Ca^{2+} ATPase reticulares sarcoendoplasmático

A bomba de SERCA está localizada no RE, o principal depósito de Ca^{2+} na célula. Esta bomba consegue transportar o Ca^{2+} para o lúmen do RE contra o seu gradiente eletroquímico, consumindo energia através da hidrólise de ATP (Carreras-Sureda, Pihán, & Hetz, 2018). As proteínas SERCA são codificadas por três genes ATP2A1–3, que são expressos de forma diferencial dependendo do tipo de célula e tecido. A SERCA1 é expressa no músculo esquelético adulto e neonatal; a SERCA2a, que é expressa no músculo esquelético e a SERCA2b é expressa no músculo liso bem como em todos os tipos de células; e a SERCA3 está presente em alguns tipos de células endoteliais, células β , células do pulmão e nos neurónios (Hoorn, 2017). Assim, o papel de SERCA resulta da expressão diferencial destas isoformas mencionadas, e esta bomba é essencial para restabelecer o influxo de Ca^{2+} . A proximidade entre o RE e a mitocôndria garantem a formação de

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

microdomínios de elevadas concentrações de Ca^{2+} , permitindo que as mitocôndrias absorvam o cálcio (Raffaello, Mammucari, Gherardi, & Rizzuto, 2016).

O RS está presente no músculo esquelético estriado, ao longo do sarcómero. Este está profundamente relacionado com outras estruturas membranosas, tais como o sistema tubular T, uma invaginação do Sarcolema. Em conjunto, o RS e o sistema tubular T regulam o influxo de Ca^{2+} aquando o relaxamento e contração muscular (Koenig et al., 2019). A comunicação entre o sistema tubular T e o RS é efetuada através do recetor de diidropiridina (DHPR) e do recetor de riadonina (RyR1) (Figura 6). O DHPR liga-se ao RyR1, sendo que este último promove a libertação de Ca^{2+} . A remoção de Ca^{2+} é realizada pela PMCA (membrana plasmática de Ca^{2+} ATPase) e pelas bombas de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Periasamy et al., 2017).

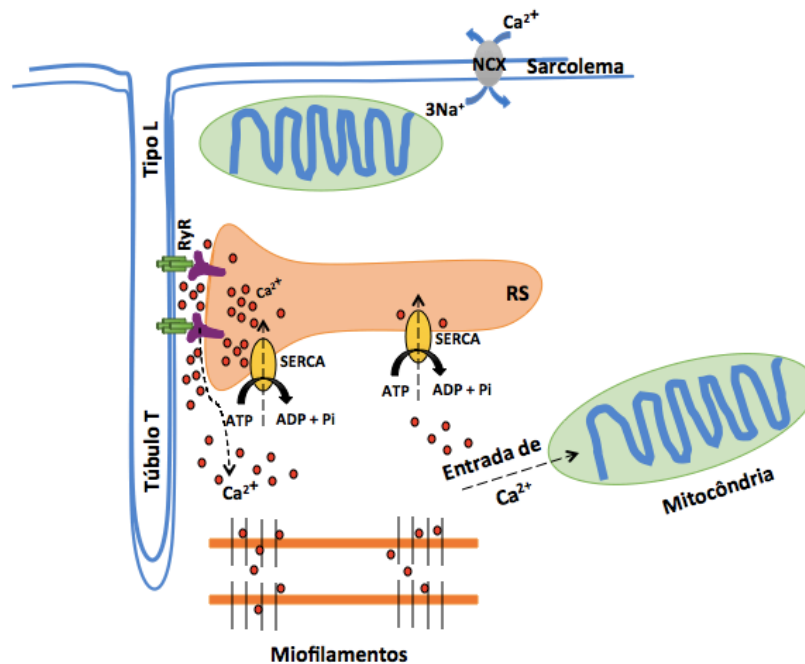


Figura 6. Papel do RS na ligação excitação e contração muscular

A contração e o relaxamento do músculo no organelo RS dá-se principalmente, devido à libertação e absorção do Ca^{2+} . As proteínas envolvidas neste processo, são recetor de riadonina (RyR1), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers (NCX), e túbulo T, conseguem regular o influxo e efluxo de Ca^{2+} no RS (adaptado de (Periasamy et al., 2017).

1.2.3.SOCE – “Store-operated calcium”

A SOCE é uma via de entrada através da membrana plasmática do Ca^{2+} , amplamente encontrado em células eucarióticas. Para o SOCE ser ativado, tem que haver um esgotamento do armazenamento de Ca^{2+} no RE, enquanto o reabastecimento deste leva à sua inativação (Ambudkar, Brito de Souza, & Ong, 2018). A libertação de cálcio do RE através da via IP3R, leva à redução de Ca^{2+} do RE e subsequente entrada de Ca^{2+} na célula através dos canais de cálcio localizados na membrana plasmática (Ambudkar et al., 2018).

Os principais componentes do SOCE são a molécula 1 de interação estromal do sensor RE Ca^{2+} (STIM1) e dois canais, o canal formador de poros de Ca^{2+} Orai e o potencial do recetor transiente canônico 1 (TRPC1) (Ambudkar et al., 2018).

O sensor STIM contém duas famílias de proteínas, nomeadamente, o STIM1 e o STIM2. Ambas estão envolvidas na interação celular e controlam os níveis de cálcio na membrana plasmática e no RE. Quando o Ca^{2+} do RE é libertado, as proteínas STIM são ativadas e translocadas para os pontos de comunicação entre o RE e a membrana plasmática. Nesses pontos, as proteínas STIM ancoram e ativam os canais ORAI (Soboloff, Rothberg, Madesh, & Gill, 2012).

Os canais ORAI contêm três famílias, o ORAI1, o ORAI2 e ORAI3, que estão abrangidos na via secretória de transporte de Ca^{2+} ATPase-2 (SPCA2) (Majewski & Kuznicki, 2014). Estes canais ORAI contêm proteínas da membrana celular capazes de formar um poro condutor de libertação de Ca^{2+} ativado (CRAC) (Raffaello et al., 2016). A redução dos níveis de cálcio no RE está associada à ativação do canal CRAC, por outro lado, quando os níveis de cálcio são elevados, a calmodulina liga-se ao ião e forma um complexo com a proteína fosfatase calcineurina (Majewski & Kuznicki, 2014). Este complexo calmodulina- calcineurina é capaz de desfosforilar o fator nuclear de células T ativadas (NFATs), levando à migração deste para o núcleo, conduzindo à transcrição génica envolvida na proliferação e morte celular (Gwack, Feske, Srikanth, Hogan, & Rao, 2007; Hogan, Chen, Nardone, & Rao, 2003).

O TRPC1 é um canal do tipo TRPC tendo sido o primeiro membro deste grupo a ser descoberto como um componente molecular de SOCE. Dentro dos TRPCs, podemos também encontrar o TRPC5, o TRPC6 e o TRPC7 que são ativos de modo independente de armazenamento, e o TRPC3 e o TRPC4 que ficam ativos quando há redução de armazenamento de Ca^{2+} . De acordo com estudos anteriores, o TRPC2 apenas interage com o TRPC6 (Hofmann, Schaefer, Schultz, & Gudermann,

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

2002), formando um canal multimérico com propriedades regulatórias diferentes do TRPC individuais e capazes de regular o influxo de cálcio. O TRPC1 é um canal fundamental para o funcionamento do SOCE, este interage com o STIM1, formando o complexo STIM-ORAI1-TRPC1 (Figura 7) capaz de regular os níveis de Ca^{2+} no RE (K. P. Lee et al., 2014). Apesar de alguns canais da subfamília TRPC serem capazes de formar heterómeros quando expressos de forma isolada, tais como TRPC4-TRPC4 (Beech, 2013). Por outro lado, o TRPC1 é incapaz de formar canais permeáveis ao Ca^{2+} sozinho, mas é fundamental para a formação de heterómeros com todos os outros membros TRPC (Storch, Forst, Philipp, Gudermann, & Mederos Y Schnitzler, 2012).

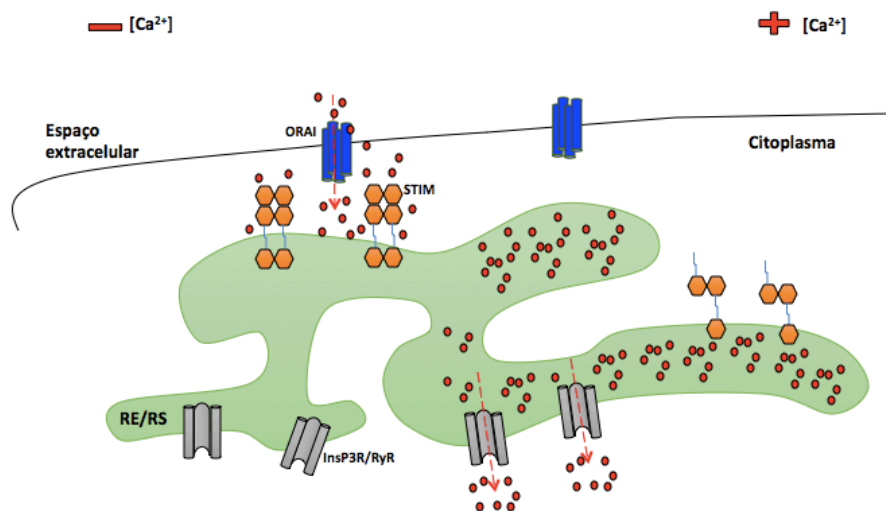


Figura 7. Entrada de cálcio através da via SOCE

Quando há diminuição da concentração de Ca^{2+} , STIM consegue formar dímeros capazes de atrair o canal ORAI1, induzindo o influxo de Ca^{2+} . Quando há aumento da concentração de Ca^{2+} , STIM não consegue formar dímeros, logo a via SOCE fica inativada (Raffaello et al., 2016).

A regulação do cálcio no RE tem uma relação íntima com as mitocôndrias, tendo sido propostos dois mecanismos de comunicação via cálcio entre estes dois organelos. Existem outros dois modelos para a regulação de SOCE. No modelo 1, as mitocôndrias durante a ativação de uma célula T, são posicionadas na membrana plasmática (Figura 8), conseguindo reduzir diretamente o influxo de Ca^{2+} no RE, evitando a inativação deste no ORAI1 (Paupe & Prudent, 2017).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

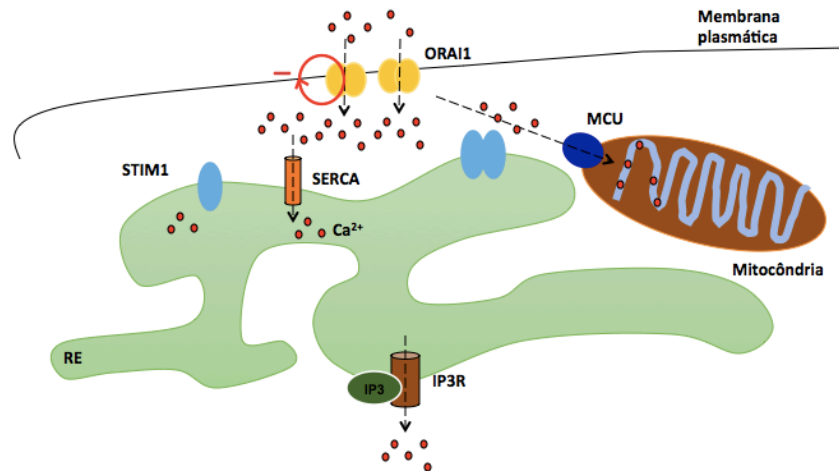


Figura 8. Modelo 1 (célula imune) na regulação da via SOCE

Neste modelo apresentado, durante a ativação de uma célula imune, as mitocôndrias conseguem ser posicionadas na membrana plasmática, atuando diretamente com o ORAI1, reduzindo assim o aumento de Ca^{2+} no RE (Paupe & Prudent, 2017).

No modelo 2, as mitocôndrias com o auxílio do IP3, atuam diretamente no RE durante a libertação do Ca^{2+} (Figura 9). Se ocorrer alguma obstrução no RE, as mitocôndrias não conseguem abrandar o cálcio nestes locais, logo as mitocôndrias têm como função a redução no armazenamento de cálcio no RE, contribuindo assim para a estimulação da via SOCE (Paupe & Prudent, 2017).

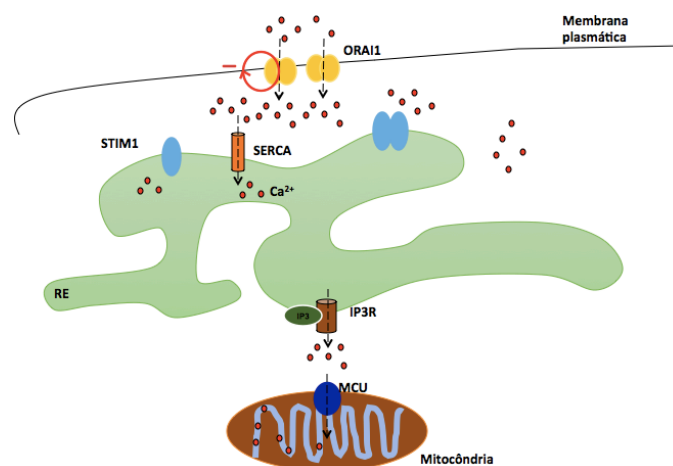


Figura 9. Modelo 2 (modelo alternativo) na regulação da via SOCE

Neste modelo, as mitocôndrias conseguem reduzir os níveis de Ca^{2+} no RE, pois atuam diretamente com o RE, contribuindo para a ativação da via SOCE (adaptado de (Paupe & Prudent, 2017).

1.2.4. MCU – “Mitochondrial calcium uniporter”

Uma outra via que regula a absorção de Ca^{2+} é o MCU, capaz de transferir o Ca^{2+} para o interior da mitocôndria que anteriormente é captado pelo canal aniônico dependente de voltagem (VDACs), presente na membrana mitocondrial externa (MME) (Paupe & Prudent, 2017). Assim, é através do MCU que se dá a absorção de Ca^{2+} nas mitocôndrias formando vários tipos de complexos multiproteicos como o MCU, MCUb junto com MICU1, MICU2 e EMRE (Figura 10). O MCU é regulado por MICU1 e MICU2, que são proteínas, localizadas no espaço intermembranar. O MICU1 é uma subunidade reguladora, com a função de formação de poros (Raffaello et al., 2016) e é mais relevante detetor de MCU (Figura 10).

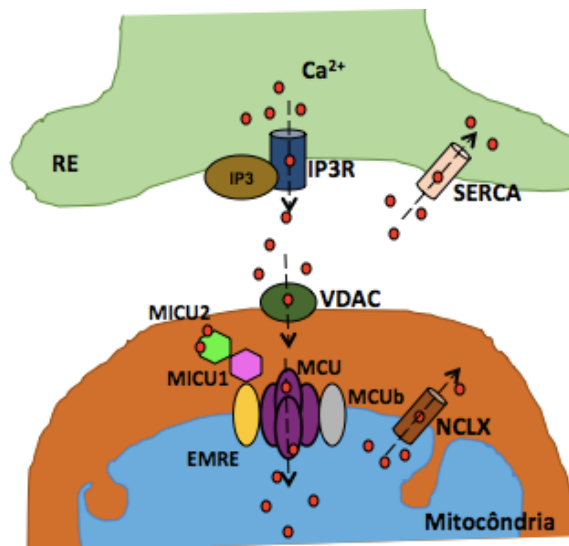


Figura 10. Local de contato do RE para a Mitocôndria

O cálcio é expulso pelo RE através do recetor IP3, entrando assim na mitocôndria através do canal VDAC. Quando o Ca^{2+} está presente nas mitocôndrias, o MCU é o principal canal responsável pela absorção do Ca^{2+} , formando complexos multiproteicos. O MICU1 é o canal regulador para a formação de poros. O Ca^{2+} é expulso deste organelo através do NCLX (adaptado de (Paupe & Prudent, 2017)).

Na presença de baixos níveis de Ca^{2+} , o MICU1 consegue inibir a atividade MCU, no entanto quando os níveis de cálcio são elevados, o Ca^{2+} liga-se ao MICU1, ativando o MCU (Figura 11) (Paupe & Prudent, 2017). O MUCb é outra isoforma de MCU, que consegue reduzir a concentração de Ca^{2+} nas mitocôndrias por uma estimulação agonista. Por outro lado, a proteína EMRE tem a função de inibir a entrada de cálcio na mitocôndria, pois a MCU consegue aumentar o Ca^{2+} e interage com as subunidades MICU1 e MICU2 (Raffaello et al., 2016). Quando há um aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma, ocorre uma alteração da conformação do

 IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

dímero, ocorrendo a inibição de MICU2, e não do MICU1, pois a função deste é de ativar e estimular o canal (Raffaello et al., 2016).

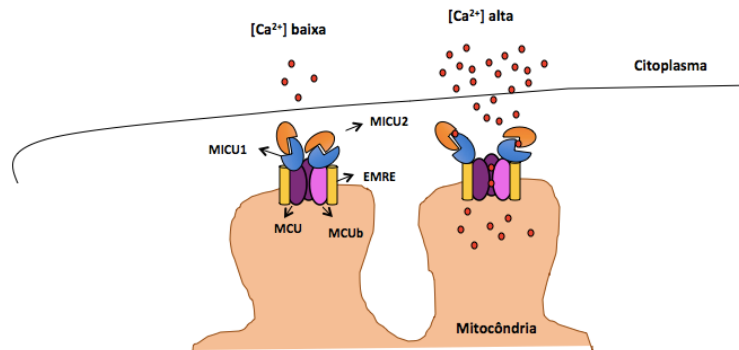


Figura 11. Representação do “mitochondrial calcium uniporter” (MCU)

Quando estamos perante de níveis baixos de concentração de Ca^{2+} , o MICU1 consegue inibir a atividade MCU, ao passo que quando existe concentrações elevadas deste ião, vai ocorrer uma mudança conformacional do dímero, ocorrendo a inibição de MICU2 em vez de MCU1, estimulando assim o canal (adaptado de (Raffaello et al., 2016).

1.2.5. NAADP – Ácido Nicotínico adenina fosfatase dinucleotídica

O ácido nicotínico adenina fosfatase dinucleotídica (NAADP) é outra via que regula os níveis de Ca^{2+} , neste caso nos lisossomas que são descritos como organelos de reserva de Ca^{2+} (Raffaello et al., 2016). O NAADP pertence a uma superfamília de moléculas de sinalização, denominados por adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), assim como os seus metabolitos. Existem dois modelos que explicam a formação de NAADP. De acordo com um destes modelos (Figura 12), o NAD é convertido em CD38, que por sua vez forma a adenosina difosfato ribose cíclica extracelular (cADPR) e a adenosina difosfato ribose (ADPr). Após a formação destes metabolitos, o ADPr liga-se ao potencial recetor transiente do canal catiónico não específico, o substituto melastatina 2 (TRPM2) e o cADPR que liberta o Ca^{2+} do ER através dos recetores de rianodina (RyR) (Guse & Wolf, 2016). Quando ocorre uma estimulação celular, o NAADP é produzido e liberta Ca^{2+} dos depósitos endógenos deste. Todos estes metabolitos são reguladores da concentração de Ca^{2+} (Guse & Wolf, 2016)

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

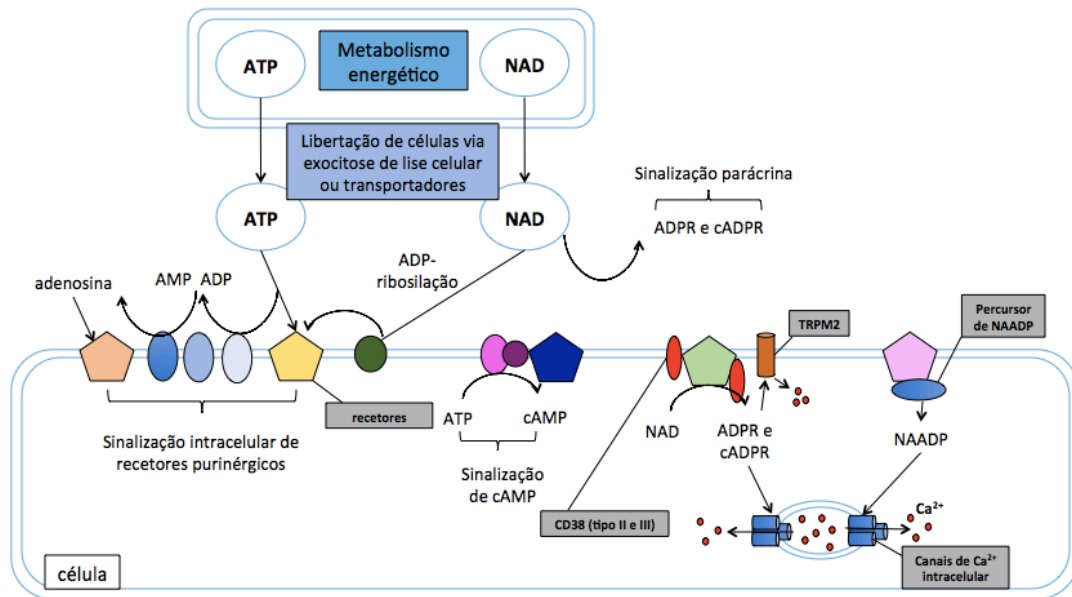


Figura 12. Nucleótidos de adenina reguladores intra e extracelulares (Guse & Wolf, 2016)

Durante o metabolismo energético, vai ocorrer liberação de células de lise celular bem como transportadores. Quando o NAD se liga ao recetor, este é convertido em CD38, formando cADPR e ADPR, ligando-se ao TRPM2. Assim, o cADPR vai libertar o Ca^{2+} existente no RE através dos canais RyR (adaptado de (Guse & Wolf, 2016).

Outro modelo refere a existência de uma ligação mediada por iões de Ca^{2+} na interface lisossoma e o RE. Neste modelo, ocorre a liberação de Ca^{2+} no RE através do NAADP, que por sua vez vai atuar nos canais (TPCs), localizados nos lisossomas, que induz a liberação de Ca^{2+} para o citoplasma (Figura 13). Assim, a concentração de Ca^{2+} na interface entre o lisossoma com o RE vai aumentar, ativando o IP3R, fazendo com que ocorra uma maior liberação de Ca^{2+} (Raffaello et al., 2016).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

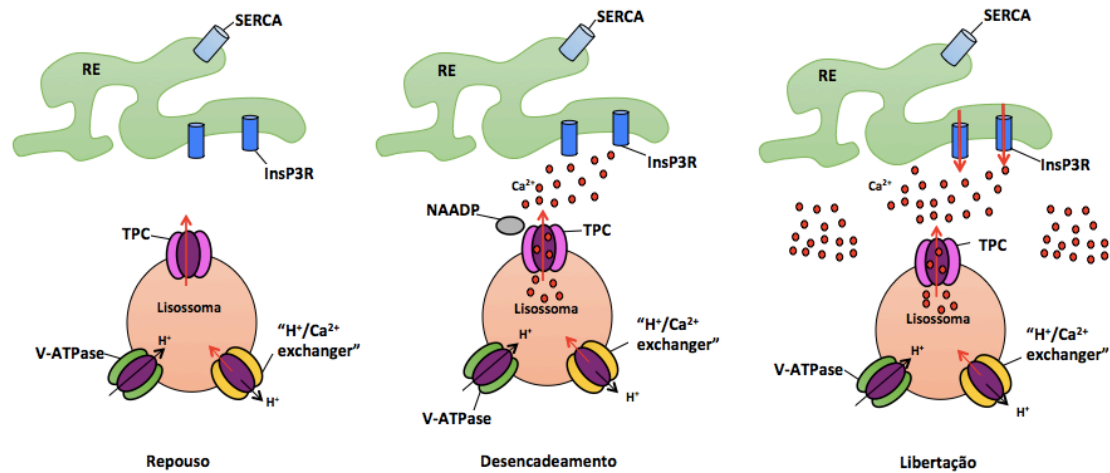


Figura 13. Libertação de Ca^{2+} induzida por NAADP

Neste modelo representado, a libertação de Ca^{2+} é realizada através dos canais NAADP, atuando assim nos TPCs libertando este íon para o citoplasma. A concentração de Ca^{2+} no citoplasma vai estar aumentado entre o RE e o lisossoma, ativando os recetores do IP3, aumentando os níveis de Ca^{2+} (adaptado de (Raffaello et al., 2016))

Os canais TPCs, localizados na membrana lisossomal que transportam o Ca^{2+} são denominados por canais de membrana de 2 poros, com duas subfamílias o TPC1 e TPC2. Como já foi referido no modelo anterior, são estimulados pelo NAADP, que em conjunto libertam o Ca^{2+} no citosol, abrindo um poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP), que pode levar à morte celular se ocorrer um aumento dos níveis de Ca^{2+} (Giannopoulos et al., 2018).

1.2.6. TRPML

Outro recetor presente nos lisossomas é TRPML que contém 3 isoformas, o TRPML1, o TRPML2 e o TRPML3, sendo estes recetores adicionais de NAADP, residentes da via endocítica. O recetor mais conhecido é o TRPML1 que se expressa na maioria de tecidos e também nos lisossomas. Para que a homeostasia dos lisossomas se mantenha é necessária a fusão entre as vesículas endocíticas de forma a promoverem a libertação do Ca^{2+} . Neste caso a libertação de Ca^{2+} vai ocorrer a partir do endolisossoma através do canal TPCs e do TRPML (Figura 14). A entrada do Ca^{2+} no lisossoma é conseguida através do “ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers” que depende de ATP. O fornecimento de energia necessária para este mecanismo de influxo é conseguido através da atividade vacuolar tipo H^+ -ATPase (V-ATPase) (Raffaello et al., 2016).

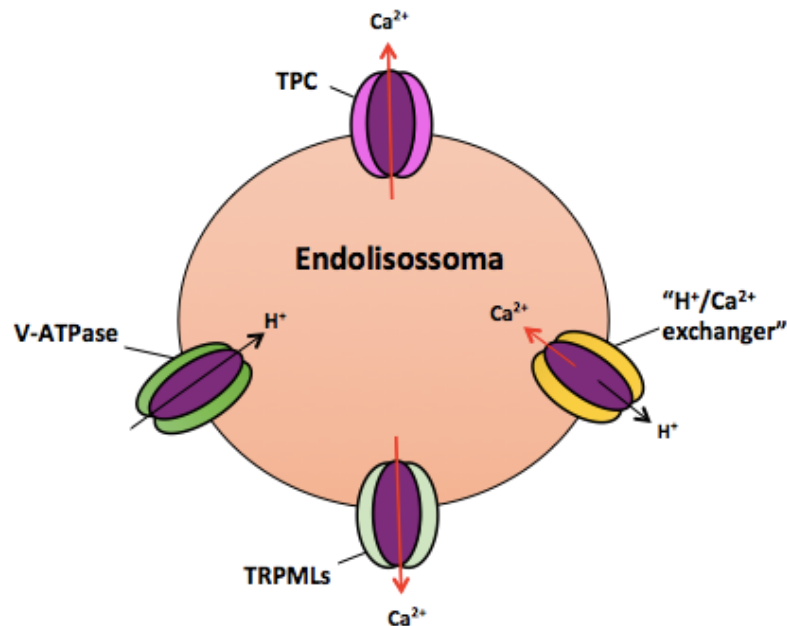


Figura 14. Canais iônicos e transportadores no endolisossoma

Para a homeostasia nos lisossomas, as vesículas endocíticas têm que se fundir, para que haja a libertação de Ca^{2+} . Esta libertação acontece pelos TPCs e TRPMLs. O efluxo de Ca^{2+} é feita através do " $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers" e o influxo é através do canal V-ATPase (adaptado de (Raffaello et al., 2016)).

O Ca^{2+} também pode ser libertado do lisossoma através do TRPML1, levando à ativação da calcineurina e do fator de transição EB (TFEB) (Raffaello et al., 2016). O TFEB, modula a transcrição de genes envolvidos em vários processos, como a biogénese lisossómica, autofagia e excitose. Esta proteína TFEB é regulada pela fosforilação, que em condições ricas em nutrientes, é fosforilada por mTORC1 e em condições de ausência promove a desfosforilação de TFEB. Assim, em condições de ausência de nutrientes, o influxo de Ca^{2+} no lisossoma através do canal TRPML1, conduz ao transporte de Ca^{2+} para o núcleo (Regulation, Paola, & Medina, n.d.).

1.2.7. SPCA

O complexo de Golgi contém várias proteínas capazes de regular os níveis de Ca^{2+} que são expressos no RE, nomeadamente a bomba SERCA acima descrita. A via secretória Ca^{2+} - ATPases é outro mecanismo de via secretória de transporte de Ca^{2+} ATPase (SPCA), esta localiza-se nos compartimentos do complexo de Golgi e nas vesículas pós- Golgi. Após a ativação celular, o SPCA é o principal sistema de

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

recuperação de cálcio neste organelo intracelular (Rodríguez et al., 2018). Existe dois genes diferentes que codificam a SPCA, o SPCA1 e o SPCA2. O SPCA1, é expressa em todas as células, e especificamente, alta em queratinócitos epidérmicos humanos, enquanto que o SPCA2 tem uma expressão celular e tecidual mais restrita, sugerindo uma função mais especializada para este tipo de canal (Pizzo, Lissandron, Capitanio, & Pozzan, 2011). Estas proteínas parecem desempenhar um papel redundante, o que é corroborado pelo facto de serem altamente conservadas em regiões fundamentais para a sua atividade. Contudo, a SPCA2 parece ter uma afinidade menor de ligação ao Ca^{2+} e menor retorno no transporte deste ião para a via secretora (Xiang, Mohamalawari, & Rao, 2005).

1.2.8. TMBIM4

O TMBIM4, também conhecido como LFG4, S1R, proteína Z ou GAAP, é outra proteína capaz de regular os níveis de Ca^{2+} celulares, sendo expresso no complexo de Golgi e RE na maioria dos tecidos (Gubser et al., 2007). Esta proteína transmembranar é capaz de modelar a entrada e libertação de Ca^{2+} mediada por IP3. De facto, a sobreexpressão de TMBIM4 conduz à redução dos níveis de reservas de Ca^{2+} intercelulares, diminuindo a eficácia de IP3. A capacidade modeladora do TMBIM4 na homeostasia e sinalização do Ca^{2+} permite que esta proteína seja capaz de mediar a adesão e migração celular (Carrara et al., 2015; Saraiva et al., 2013). Por outro lado, a inibição de TMBIM4 por siRNA conduz à apoptose (Yonashiro et al., 2009), de forma semelhante aos efeitos resultantes da inibição de TMBIM6 ou TMBIM2. Em linha com estas observações, o TMBIM4 tem uma vasta atividade antiapoptótica, sendo capaz de proteger as células de tratamentos com doxorrubicina. Além disso, a sobreexpressão de TMBIM4 é capaz de inibir a morte celular induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) e FasL (Gubser et al., 2007).

Capítulo III
Papel do Ca^{2+} nas Células Tumerais

1.1 DESENVOLVIMENTO TUMORAL PELO IÃO Ca^{2+}

O Cancro é uma condição patológica que resulta do crescimento e proliferação anormal das células. Este descontrolo pode ter origem em alterações dos mecanismos de apoptose e proliferação celular, conduzindo ao crescimento e homeostasia tecidulares anormais.

1.1.1. Papel do Ca^{2+} no desenvolvimento do cancro

A obtenção de energia por parte das células tumorais é distinta das células saudáveis. Nas células saudáveis, a energia é produzida via fosforilação oxidativa, por outro lado, nas células tumorais há uma alteração metabólica que conduz a célula a usar a glicólise aeróbica para satisfazer as suas necessidades metabólicas (Heiden, Cantley, & Thompson, 2009). O gatilho para a geração de ATP é o ião Ca^{2+} . Deste modo, o Ca^{2+} desempenha um papel fundamental para a produção de energia nestas células, permitindo o seu crescimento anormal.

As mitocôndrias, organelos essenciais à produção de energia, captam o Ca^{2+} através de dois canais, tais como o VDCA e MCU e é removido pelo NCLX. Se o Ca^{2+} estiver em excesso dentro das mitocôndrias, ocorre a abertura do PTP, segue-se a despolarização da membrana externa e consequente libertação do citocromo C, iniciando-se assim o processo de apoptose. Como podemos identificar na Figura 15, existem duas etapas de ligação e libertação de Ca^{2+} , sucedendo a modulação das funções mitocondriais e o impacto da sua sinalização na função celular. As células tumorais desenvolvem mecanismos de forma a prevenir o excesso de Ca^{2+} nas mitocôndrias e ativar assim, o processo de apoptose. Este organelo intracelular, tem uma relação íntima com o RE, no que diz respeito à regulação do Ca^{2+} . Se o Ca^{2+} contido no RE tiver diminuído, as células tumorais conseguem contornar os processos de apoptose e este ião consegue induzir o VDAC, aumentando a absorção de Ca^{2+} e promovendo a migração de células tumorais (Palty et al., 2010; Rowland & Voeltz, 2012).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

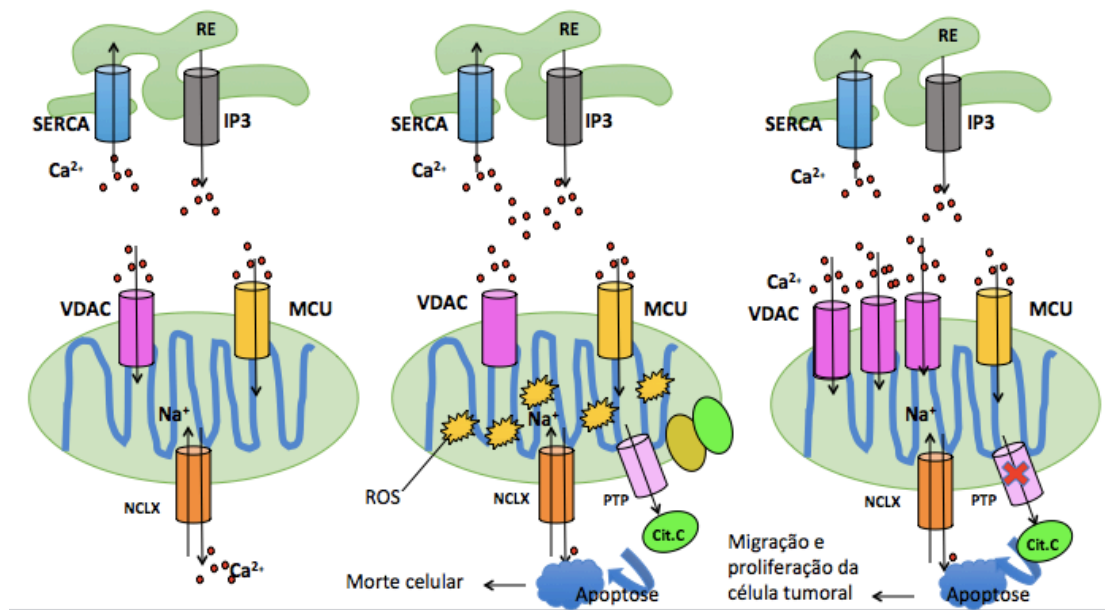


Figura 15. A mitocôndria durante o estado estacionário, sobrecarga de Ca^{2+} e célula tumoral

Para evitar a sobrecarga de Ca^{2+} nas mitocôndrias, este é removido através do NCLX. Quando existe Ca^{2+} nas mitocôndrias, o PTP abre, libertando assim o citocromo C ativando a apoptose e de seguida a morte celular. Quando ocorre numa célula cancerígena, a sobrecarga de Ca^{2+} é evitada nas mitocôndrias, logo o PTP não abre, evitando a apoptose. A VDAC aumenta com os níveis elevados de Ca^{2+} , promovendo a migração celular (adaptado de (Putney, 2005).

A sinalização de Ca^{2+} entre o RE e as mitocôndrias é capaz de induzir a apoptose (Giorgi et al., 2015). Múltiplos supressores tumorais estão envolvidos na ativação deste processo, dentro dos quais o p53, PTEN, PML, BRCA1 e Beclin1. A proteína p53 é um destes supressores tumorais com maior impacto na promoção da apoptose. Este supressor tumoral pode atuar como um fator de transcrição capaz de controlar a morte celular (Gottlieb, Leal, Seger, Taya, & Oren, 2002) ou por outro lado, atuando como um mecanismo dependente de Ca^{2+} capaz de controlar a comunicação via membrana associada às mitocôndrias. A proteína p53 é também capaz de comunicar com RE via SERCA, modificando o seu estado oxidativo, o que conduz a um aumento do influxo de Ca^{2+} para as mitocôndrias, promovendo a apoptose (Giorgi et al., 2015).

1.1.2. Papel do Ca^{2+} no ciclo celular

A divisão celular participa na regulação dos mecanismos de proliferação e corresponde ao conjunto de processos que permitem a perpetuação celular (Gao & Liu, 2019). A divisão celular está dividida em 4 fases: a fase G1 (crescimento); a fase S (crescimento e duplicação do DNA); a fase G2 (crescimento e preparação para a mitose); e a fase de mitose (divisão do material genético e citocinese). No entanto, se algumas células não conseguirem passar pela divisão celular eficazmente, entram em fase G0, permanecendo indefinidamente na interfase (Barnum & O'Connell, 2014). O ciclo celular é regulado por múltiplas ciclinas e quinase dependentes de ciclinas (CDKs). Estas proteínas só conseguem ter atividade quando ligadas a uma ciclina, conseguindo assim, ativar ou inativar as fases do ciclo celular. As ciclinas presentes no ciclo celular são: na fase G1, a ciclina D (CDK4 e CDK6); na fase S, a ciclina E (CDK2); na fase G2, a ciclina A (CDK1) e na fase M, a ciclina B (CDK1). As CDKs são reguladas por uma cinase ativadora de CDK (CAK) e por proteínas inibidoras de CDK (L. Ding et al., 2020).

O cálcio é capaz de regular diversos processos celulares de forma a evitar alterações na homeostasia e interromper o ciclo celular. As alterações dos níveis de Ca^{2+} desempenham um papel fundamental numa fase inicial de G1, transição de fase G1/S e G2/M (Pande, Anil Kumar, & Manogaran, 1996). Particularmente, alterações nos níveis de Ca^{2+} na transição de fase G1/S estão descritas em linhas de células imortalizadas e acompanham a replicação do DNA (Toyota, Ho, Ohe-Toyota, Baylin, & Issa, 1999). As células são mais suscetíveis a alterações dos níveis de Ca^{2+} extracelulares na fase G1, sendo que este íão é imperativo para a expressão de diversos genes envolvidos no desenvolvimento tumoral, tais como *FOS*, *JUN* e *MYC*. Mais tarde na transição G1/S, o Ca^{2+} é capaz de fosforilar e ativar o retinoblastoma (RB1) (Takuwa, Zhou, Kumada, & Takuwa, 1993). O RB1 é um supressor tumoral que quando inativo permite que as células sofram alterações genéticas e passem por uma síntese de DNA não controlada, permitindo assim uma acumulação de danos potencialmente oncogénicos. Um oncogene que desempenha um papel importante, é o Ras. O íão Ca^{2+} quando está presente no citoplasma, consegue estimular através da modulação de GEF (fator de troca de guanina) ou inibir o Ras, através da GAP (proteína de GTase) (Figura 17). Quando este oncogene é ativado, estimula a via MAPK (proteína quinase ativada por proliferação de mitogénio) conseguindo assim que a célula passe da fase G1 para a S, quando

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

Ras ativa o GAP, aumentando a expressão de ciclina D1, que permite a fosforilação de RB1 e a libertação do fator de transcrição E2F (Roderick & Cook, 2008).

A fase G1-M é regulada pela calmodulina (CaM) (Rasmussen & Means, 1989), uma proteína multifuncional capaz de se ligar ao Ca^{2+} , ativando outras proteínas (Flory, Moser, Monnat, & Davis, 2000) com domínios de ligação CaM (Fukasawa, 2007). Esta desempenha um papel importante no desenvolvimento do ciclo celular na fase G1-M (Rasmussen & Means, 1989) e os antagonistas da CaM ou os inibidores de CaM quinase (CaMK), conseguem bloquear o ciclo celular durante ou depois da fase G1, conseguindo que as células fiquem menos sensíveis após fosforilar a RB1. As proteínas CaMK e a fosfatase dependente de Ca^{2+} /CaM (CaN), conseguem ativar múltiplas vias de sinalização, nomeadamente as ativadas pelo NFAT e NF κ B (Berridge, Lipp, & Bootman, 2000), permitindo a regulação da expressão génica (Crabtree, 1999). O NFAT localiza-se no citoplasma num estado inativo fosforilado. Uma vez desfosforilado, este conduz a um aumento dos níveis de Ca^{2+} , o que permite a sua entrada no núcleo e a regulação da expressão génica (Hogan et al., 2003). Curiosamente, existe um membro da família dos vanilóides, o TRPV6, e também o TRPC6 que são dependentes de NFAT (Figura 16), conseguindo interferir na expressão de múltiplos genes (Lehen'kyi, Flourakis, Skryma, & Prevarskaya, 2007; Thebault et al., 2006).

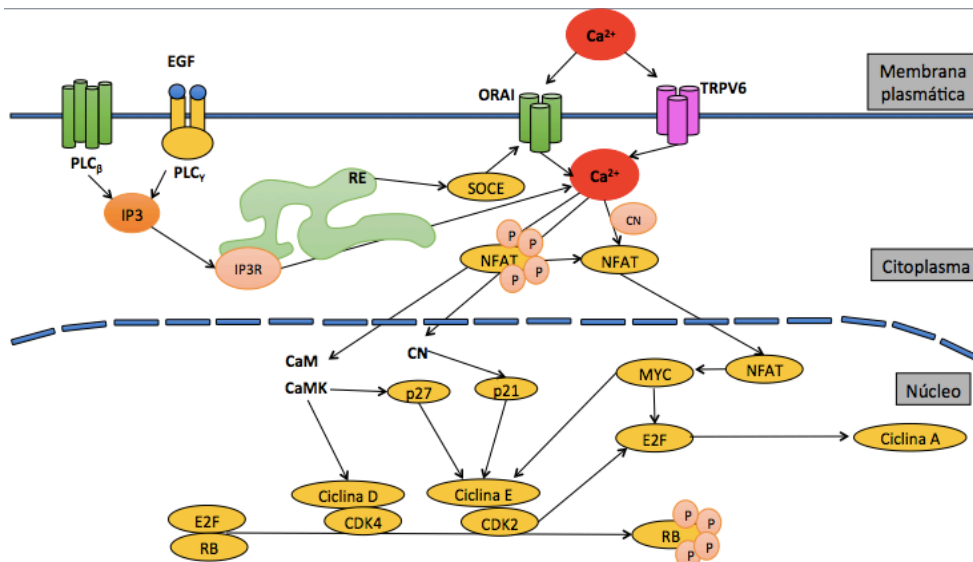


Figura 16. Vias de sinalização de Ca^{2+} durante a fase G1.

A entrada de Ca^{2+} pode ser realizadas por diversos canais, mas durante a fase G1 para a fase S os canais ORAI e TRPV6, são um dos mais importantes para a calcineurina, promover a desfosforilação de NFAT, estando ligado depois ao MYC, promovendo à fosforilação do RB, ativando anteriormente as ciclinas CDK4 e CDK2 (adaptado de (Roderick & Cook, 2008)).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

Particularmente, no cancro da próstata, a expressão do canal TRPV6 resulta numa maior entrada de Ca^{2+} na célula, aumentando a ativação de NFAT (Van Abel, Hoenderop, & Bindels, 2005).

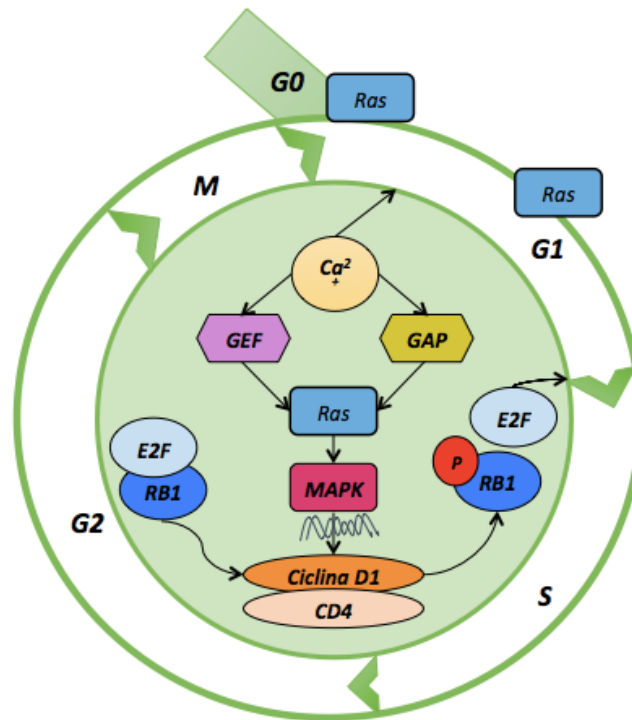


Figura 17. Ras durante o ciclo celular

O íon Ca^{2+} consegue estimular o GEF ou consegue inibir o GAP. Quando este oncogene é ativado, vai estimular a via MAPK, conseguindo assim que a célula progrida da fase G1 para a fase S do ciclo celular, mas se ativar o GAP, vai ocorrer uma fosforilação de RB, libertando o fator de transcrição E2F (adaptado de (M. M. Xu et al., 2018)).

A ativação transcricional de CaMK e CaN, é também regulada por oscilações de cálcio através dos canais STIM e ORAI (componentes do SOCE) podendo levar à proliferação celular. A inibição da CaMK conduz a uma perda da expressão da ciclina D, aumenta a expressão de p27, inibe a CDK2 e CDK4 e provoca atraso em G1 (Kahl & Means, 2004). A CaN é também importante na progressão das fases G1 e S. De facto, a inibição da CaN inibe a atividade de CDK2, os níveis das ciclinas A e E (Figura 17).

Existe uma variedade de proteínas que garantem que a célula não progrida durante o ciclo celular. Na presença de erros durante o ciclo celular, este é interrompido conduzindo à apoptose. Na apoptose existe uma via intrínseca, monitorizada pela

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

permeabilização da membrana mitocondrial (PMM), que é regulada pelos íões de Ca^{2+} , capaz de ativar o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PMPT) (Figura 18) (Červinka, 1999). A PMM pode ser conduzida pelas proteínas BAX e BAK capazes de regular a transferência de Ca^{2+} do RE para as mitocôndrias. Quando os níveis de Ca^{2+} aumentam nas mitocôndrias, ocorre a abertura do PMPT e conseqüentemente a apoptose (Meier & Vousden, 2007).

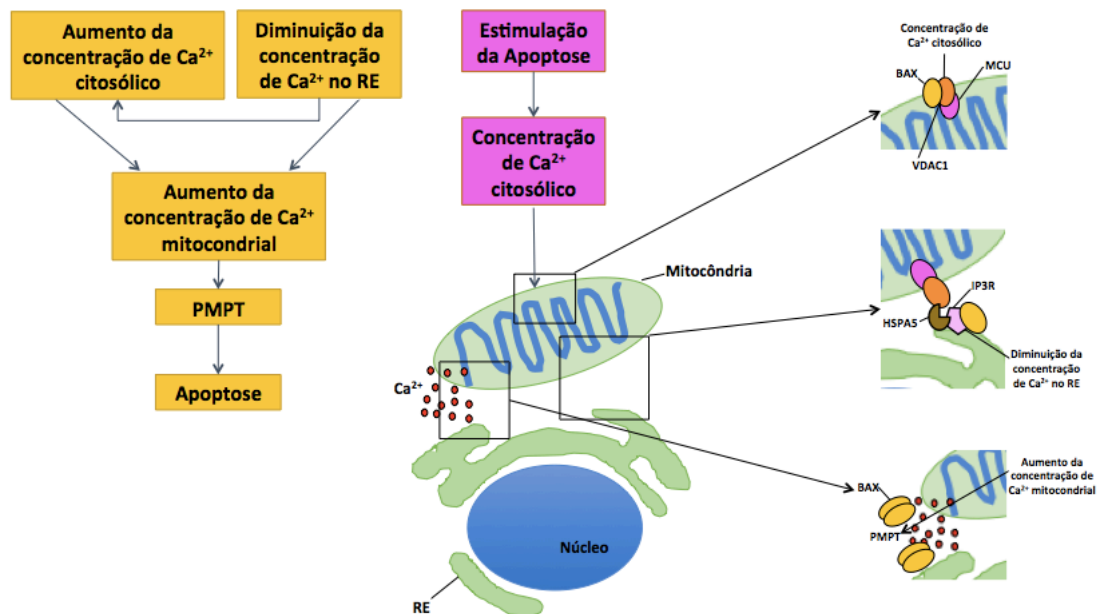


Figura 18. PMPT na apoptose

Quando há aumento dos níveis de Ca^{2+} no citoplasma ou diminuição no RE, aumenta os níveis de Ca^{2+} nas mitocôndrias levando assim à abertura do PMPT, levando à morte celular programada, ou seja, à apoptose (adaptado de (Humeau et al., 2018).

A proliferação descontrolada das células e a resistência contra a morte celular (Enfissi, Prigent, Colosetti, & Capiod, 2004), são importantes mecanismos regulados pelos oncogenes através da modelação dos gradientes de Ca^{2+} . Sendo que a concentração de Ca^{2+} numa célula tumoral é muito superior à concentração deste íão numa célula normal (Hanson, Bootman, Distelhorst, Maraldi, & Roderick, 2008). Os níveis de Ca^{2+} , tal como já referimos, podem ser controlados por vários canais dependentes de íão. Por exemplo, a inibição da expressão de ORAI ou do potencial de recetor transitório conduz a uma redução dos níveis de cálcio e conseqüente inibição da proliferação celular (Capiod, 2012). Do mesmo modo, também os canais VGCCs e SERCA2 estão envolvidos na proliferação celular, o que nos indica que

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

estes canais estão envolvidos no desenvolvimento tumoral (Prevarskaya, Ouadid-Ahidouch, Skryma, & Shuba, 2014; Sobradillo et al., 2014). Nomeadamente, a manutenção de linhas celulares do cancro da próstata depende da expressão de SERCA2 e dos níveis de cálcio no RE (McLaughlin & De Vries, 2001; Van Abel et al., 2005). Também o SOCE apresenta níveis elevados no cancro colorretal quando as reservas de Ca^{2+} estão reduzidas. Neste contexto, inicialmente há aumento da proliferação e migração celular, a migração conduz a uma limitação da acumulação de Ca^{2+} mitocondrial o que permite a sobrevivência celular (Sobradillo et al., 2014).

1.1.3. Papel do Ca^{2+} na regulação de supressores de tumor e oncogenes

A transferência de Ca^{2+} entre o RE e as mitocôndrias é regulada pelo recetor IP3 e o SERCA. Existem como proto-oncogenes, BCL2, BCL-XL, RAS, Mcl-1, PKB/Akt, e os genes supressores de tumores, p53, PTEN, PML, BRCA1 e Beclin1. Por exemplo, o BCL2 é capaz de evitar o excesso de Ca^{2+} nas mitocôndrias uma vez que impede a abertura do MPTP e conseqüentemente a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) (Monteith, McAndrew, Faddy, & Roberts-Thomson, 2007; Ortega, Malumbres, & Barbacid, 2002). São múltiplos os oncogenes conseguem promover a sobrevivência das células pela supressão das vias de sinalização pro-apoptóticas do RE para as mitocôndrias. Numa célula normal, o influxo de Ca^{2+} do RE para as mitocôndrias é efetuada de forma eficaz, pois os oncogenes e supressores de tumor estão em equilíbrio. Quando há um desequilíbrio dos níveis de Ca^{2+} , ou seja, um excesso deste ião, as células passam a ser controladas pela ação dos oncogenes e não dos supressores de tumor. Quando ocorre alguma alteração numa célula, como a presença de compostos tóxicos ou algum dano no DNA, o p53 estimula a bomba SERCA, aumentando assim a transferência de Ca^{2+} do RE para as mitocôndrias, ocorrendo apoptose pelo aumento de Ca^{2+} nas mitocôndrias (Figura 19). Por outro lado, quando os oncogenes Bcl-2 e Ras estão ativos na célula cancerígena, inibem a bomba SERCA e o Bcl-XL, Mcl-1 e Bcl-2 modelam o IP3R, diminuindo assim o Ca^{2+} no RE e previnem a morte celular como resultado do excesso deste ião nas mitocôndrias.

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

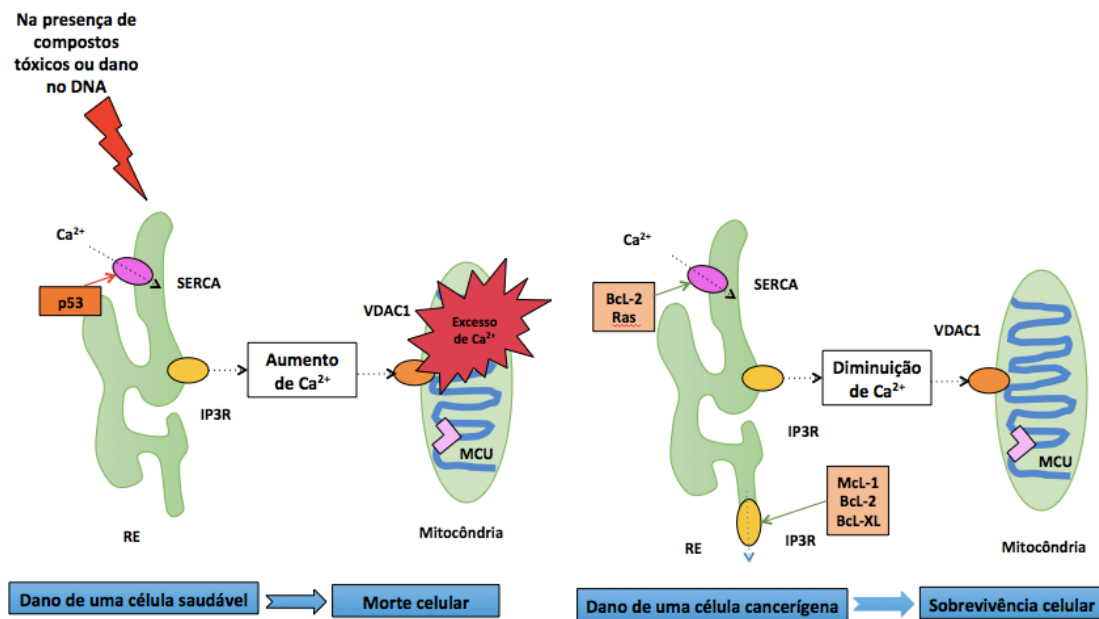


Figura 19. Resposta de dano de uma célula saudável e cancerígena

Quando há presença de compostos tóxicos ou danos no DNA, na presença de p53 o Ca²⁺ sai do RE para as mitocôndrias em excesso, levando à morte celular, ao passo que, numa célula cancerígena, na presença de BCL-2 e Ras leva a uma diminuição de Ca²⁺ para as mitocôndrias promovendo a sobrevivência da célula (adaptado de (Bittremieux, Parys, Pinton, & Bultynck, 2016))

O CaSR é um recetor que está envolvido na homeostasia do Ca²⁺ e controlo de vários mecanismos envolvidos no destino celular, tais como a secreção hormonal, controlo da proliferação, quimiotaxia e apoptose (Hofer & Brown, 2003), o que tem um grande impacto no desenvolvimento tumoral. Curiosamente, o CaSR funciona como oncogene e supressor tumoral, de acordo com o tipo de cancro (Tennakoon et al., 2016). Em cardiomiócitos de ratinho, a estimulação de CaSR conduz a um aumento da expressão do canal TRPC3, levando à acumulação de Ca²⁺ o que conduz à apoptose (S. L. Feng et al., 2011). Por outro lado, a inibição da expressão de CaSR em tecidos específicos conduz à aquisição de características semelhantes às células estaminais, o que pode levar a e manter um fenótipo maligno e resistente a quimioterápicos. A inibição deste recetor permite a reversão deste fenótipo (Díaz-Soto, Rocher, García-Rodríguez, Núñez, & Villalobos, 2016).

Capítulo IV
Papel do cálcio na motilidade de células
tumorais

1.1. INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS PELO Ca²⁺

A migração descontrolada de células tumorais a partir de um tumor primário desempenha um papel fundamental na formação de metástases e invasão dos tecidos (Yamaguchi, Wyckoff, & Condeelis, 2005). A aquisição de capacidade migratória por estas células envolve múltiplos processos, dentro dos quais, a perda de adesões celulares e o aumento das capacidades de mobilidade e invasão. Estas características permitem que as células se destaquem de um tecido primário e que sejam capazes de migrar para os tecidos circundantes de forma individual ou coletiva (Ribatti, Tamma, & Annese, 2020).

1.1.1. Indução da motilidade celular pela transição epitelial mesenquimal

Este comportamento celular está relacionado com a transição epitelial mesenquimal (TEM), um processo no qual há perda da adesão célula-célula e da polaridade celular, remodelação do citoesqueleto e mudanças na adesão das células à matriz (Pastushenko & Blanpain, 2019). Apesar da migração direcional e organizada ser uma característica das células durante o desenvolvimento, a remodelação e regeneração dos tecidos, a transformação de um fenótipo benigno num maligno está relacionada com a capacidade de invasão das células cancerígenas. Após a ativação da TEM, as proteínas epiteliais, como a Caderina-E e as Claudinas, são inibidas e as proteínas mesenquimais, como a fibronectina e as metaloproteinases (MMPs), são regulados positivamente (Figura 20). Além disso, o citoesqueleto composto por filamentos actina é intensamente reorganizado e são formadas fibras de stress (Dongre & Weinberg, 2019). A TEM pode ser controlada e estimulada por várias vias de sinalização, dentro das quais a TGF β , FGF e Notch (Roche, 2018; Sahlgren, Gustafsson, Jin, Poellinger, & Lendahl, 2008; Jingjing Sun & Stathopoulos, 2018). A via TGF β está envolvida na indução da TEM tanto durante o normal desenvolvimento como durante eventos oncogénicos. A indução da TEM via TGF β pode ocorrer diretamente ou então pela ativação de fatores de transcrição promotores de TEM, tais como Snail/Slug, Twist e ZEB1/2 (Y. Hao, Baker, & Dijke, 2019). Estes fatores transcricionais são capazes de inibir a expressão de proteínas epiteliais e estimular a produção de proteínas mesenquimais. A via TGF β é ainda capaz de estimular outras vias como JNK e ERK/ MAPK (Santibañez, 2006; Xie et al., 2004), as quais desempenham um papel fundamental na reorganização dos

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

filamentos de actina, motilidade celular e invasão. O fator de crescimento epidérmico (EGF), que é igualmente capaz de ativar a sinalização via ERK, atua muitas vezes em conjunto com a via $TGF\beta$ de forma a aumentar a progressão da TEM *in vitro* (Grände et al., 2002; Saha et al., 1999; Uttamsingh et al., 2008). A sinalização de $TGF\beta$ também pode induzir a via Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/Akt que desempenha um papel importante na TEM (Hamidi et al., 2017; Yao, Ye, Tan, Tang, & Shen Tu, 2008). A ativação da via PI3K/ Akt inicia-se com a conversão de PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) em PIP3 via PI3K. Em seguida, mTOR2 (mTOR, mSin1, mLST8 e Rictor) e PDK1 fosforilam Akt, ativando-a. Por sua vez, a Akt ativada induz a via da quinase 1 mTORC1 / S6, que aumenta a síntese de proteínas e o tamanho das células.

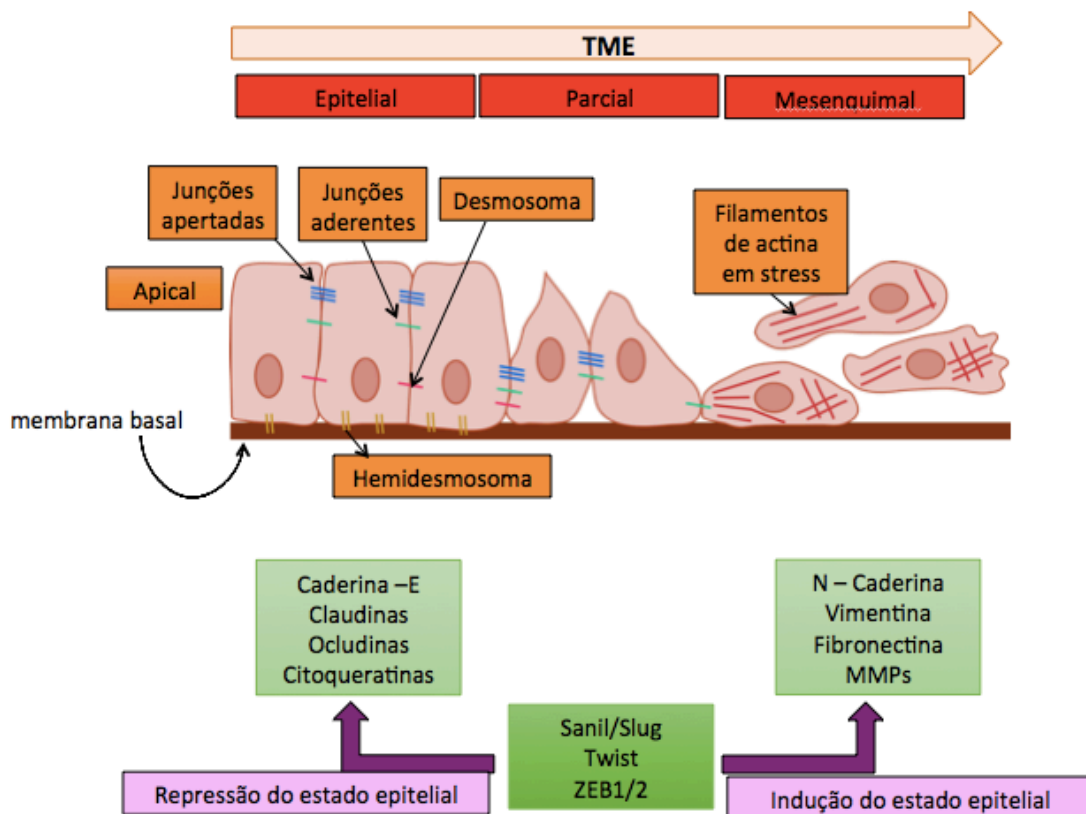


Figura 20. Transição Epitelial Mesenquimal

Durante a transição Epitelial mesenquimal, as interações célula-célula são constantemente remodeladas, levando ao descolamento das células epiteliais da membrana basal, promovendo o destino mesenquimal (adaptado de (Dongre & Weinberg, 2019).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

A via de sinalização FGF também desempenha um papel importante na regulação do comportamento mesenquimal, assim como na estimulação da TEM nas células epiteliais através do aumento da expressão de importantes genes mesenquimais que regulam a adesão e motilidade celular (Ahmad, Iwata, & Leung, 2012; Turner & Grose, 2010). A sinalização de FGF está também envolvida na reorganização do citoesqueleto de Actina por meio de uma comunicação cruzada entre Rho GTPases e PI3K, promovendo as características mesenquimais destas células que estão ligadas à motilidade celular (Jingjing Sun & Stathopoulos, 2018).

A via Notch regula a proliferação celular e apoptose, mecanismos fundamentais para o desenvolvimento e progressão de células cancerígenas (Nosedo et al., 2004). Em células endoteliais, a ativação conduz a alterações fenotípicas e funcionais características das células mesenquimais. Dentro destas alterações, observa-se a inibição de marcadores endoteliais, tais como a VE-caderina e a molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas-1, a indução de marcadores mesenquimais, tais como a fibronectina, e migração dirigida por PDGF-B (Nosedo et al., 2004).

1.1.2. Regulação da TEM via sinalização de Ca^{2+}

A alteração dos níveis de Ca^{2+} está associada à TEM de diferentes tipos de células tumorais (Iamshanova, Fiorio Pla, & Prevarskaya, 2017). As células tumorais em migração apresentam um gradiente de Ca^{2+} intracelular crescente no sentido anterior-posterior (S. A. Kim et al., 2016). Este gradiente de concentração de Ca^{2+} é garantido pela acumulação da bomba da membrana plasmática de Ca^{2+} ATPase (PMCA) em torno da célula que vai conduzir à expulsão de Ca^{2+} , como podemos verificar na Figura 21. O gradiente de Ca^{2+} é decisivo para a manutenção da polaridade morfológica anterior-posterior e restringe a formação espontânea de lamelipódios na parte posterior das células em migração, o que é necessário para migração celular direcional e persistente (Evans & Falke, 2007; F.-C. Tsai & Meyer, 2012).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

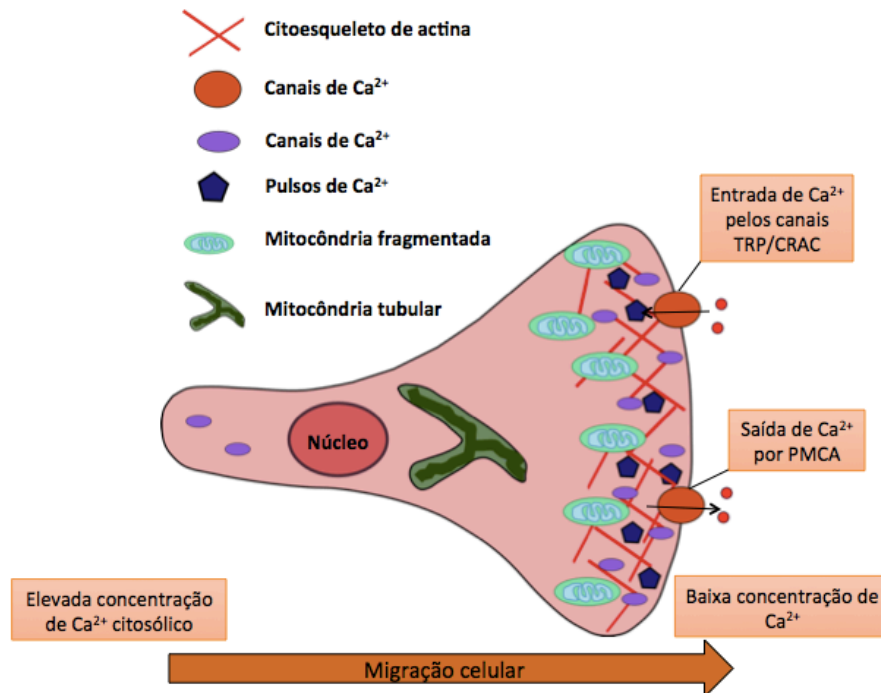


Figura 21. Sinalização de cálcio numa célula migratória

Durante a migração celular, estas contêm polaridade que é regulado pelos níveis de Ca^{2+} . Quando há elevada concentração de Ca^{2+} , vai ser libertado pela PMCA, mas quando há diminuição a entrada de Ca^{2+} vai ser feita pelos canais TRP/CRAC. Quando a célula polarizada está perante níveis elevados de Ca^{2+} , vai ocorrer uma desmontagem da adesão focal das células (adaptado de (Paupé & Prudent, 2017).

Do mesmo modo, os níveis elevados de Ca^{2+} extracelulares são também capazes de afetar a rediferenciação celular das células epiteliais da mama, o que favorece a sobrevivência das células tumorais e a colonização subsequente num outro tecido após a metástase (M. M. Xu et al., 2018). Um aumento de Ca^{2+} extracelular está ainda relacionado com o aumento do risco de metástase óssea em cancro de próstata e da mama (Das, Clézardin, Kamel, Brazier, & Mentaverri, 2020; J. Feng et al., 2014). Por outro lado, em células de cancro hepático, a quelação de Ca^{2+} intracelular é capaz de reverter a TEM induzida por doxorrubicina (Wen et al., 2016). De modo semelhante, após a exposição de células do cancro da mama a EGF e hipóxia, a quelação de Ca^{2+} citosólico livre é capaz de inibir a produção de proteínas mesenquimais como vimentina e N-caderina (Davis et al., 2014; Stewart, Azimi, Thompson, Roberts-Thomson, & Monteith, 2015). A modulação da sinalização do cálcio desempenha assim um papel importante no desenvolvimento e progressão

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

tumoral. Deste modo, as alterações na expressão dos canais de Ca^{2+} estão intimamente relacionadas com a TEM.

Estudos anteriores demonstram um aumento dos níveis de mRNA ORAI1 como resultado da sinalização de Ca^{2+} desregulada mediada via TRPC1, durante a TEM mediada por EGF (Davis et al., 2012; lamshanova et al., 2017). Outro canal da família TRPC, TRPC6, afeta a expressão de marcadores TEM em células de cancro hepático (M. M. Xu et al., 2018). Curiosamente, este canal está associado à resistência do carcinoma hepatocelular a quimioterápicos. No entanto, a inibição da sinalização de Ca^{2+} via inibição de TRPC6 resulta no restabelecimento da sensibilidade das células carcinoma hepatocelular a diversos quimioterápicos e à atenuação da TEM (El Boustany et al., 2008). Ainda em células do carcinoma hepatocelular, a sinalização de Ca^{2+} mitocondrial mediada por MUCR1 promove TEM por meio da ativação da sinalização ROS / NRF2 / NOTCH1 (Jin et al., 2019). Noutro estudo foi observado que a inibição farmacológica ou silenciadora dos canais TRPM8 conduz a uma inibição da expressão de SNAIL e Fibronectina em células de cancro da mama (J. Liu et al., 2014). Por outro lado, a indução da expressão de TRPM8 em células do cancro da mama é capaz de promover a TEM (J. Liu et al., 2014). Também os canais TRPM7 são capazes de modelar a TEM estimulada por EGF (Davis et al., 2014). Além disso, durante a resposta da TEM via EGF observam-se alterações notáveis nos níveis de transcrição de canais ER Ca^{2+} , como SERCAs, isoformas de recetores de rianodina (RYR) e IP3R (Davis et al., 2013). A inibição de STIM2 conduz a uma redução da motilidade das células do cancro da mama modelando a TEM por meio da supressão de NFAT1 (Miao et al., 2019). Os canais ORAI3 e STIM1 desempenham um papel importante na indução de TEM, modelando a transcrição de *Snai1* mediada por $\text{TGF}\beta$ (Bhattacharya et al., 2018). Em modelos de cancro colorretal, foi demonstrado que CaSR é capaz de inibir o fenótipo induzido por TEM (Aggarwal et al., 2015).

1.1.3. Remodelação da matriz extracelular via sinalização de Ca^{2+}

A remodelação da matriz extracelular (MEC) está intimamente relacionada com os fenómenos de metástases e de invasão celular (Giussani, Triulzi, Sozzi, & Tagliabue, 2019). Esta remodelação caracteriza-se pelo aumento da síntese e da deposição de colagénio, assim como num aumento da expressão de MMPs, endopeptidases dependentes de Ca^{2+} (Kehlet et al., 2016). As MMPs modelam componentes da matriz, como o colagénio (Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010),

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

conduzindo à produção e libertação de fragmentos bioativos, nomeadamente colagénios não fibrilares (Karamanos, Theocharis, Neill, & Iozzo, 2019). Os componentes da MEC ligam-se a integrinas, recetores transmembranares heterodiméricos, capazes de sinalização bidirecional e responsáveis pela ancoragem destes componentes ao citoesqueleto de actina dentro da célula (Figura 22). A adesão e desadesão celular recorrente ao substrato da MEC via integrinas e a alteração da reorganização do citoesqueleto de actina dirige vários processos celulares, dentro dos quais a migração celular (Samuel Schmidt & Friedl, 2010; Z. Sun, Guo, & Fässler, 2016).

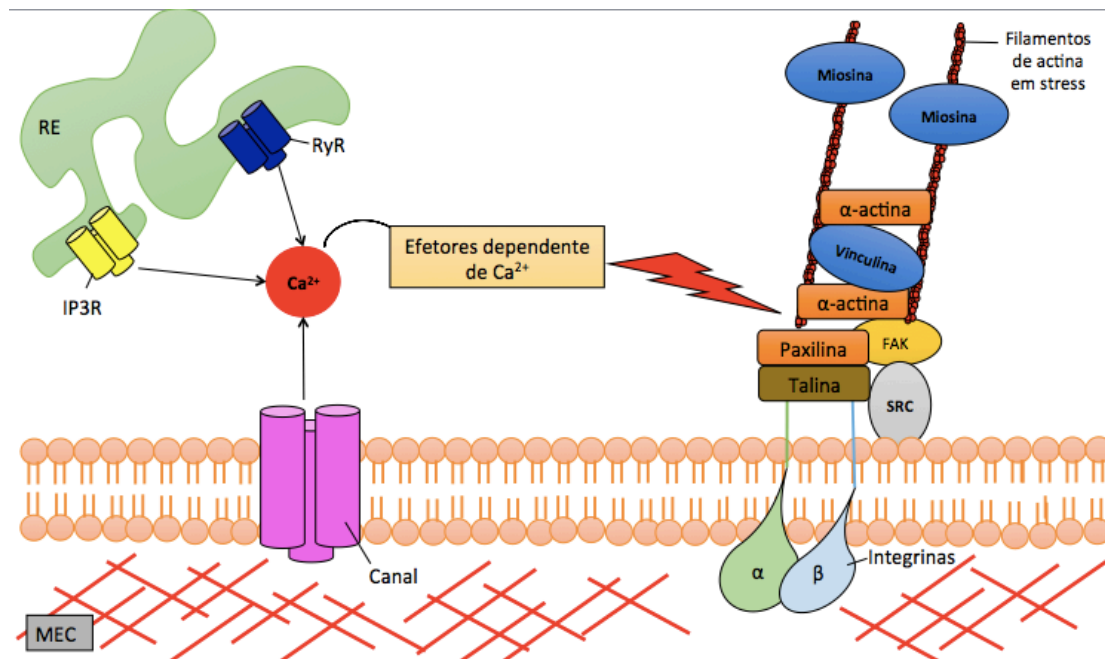


Figura 22. Complexos de adesão focal na regulação de Ca^{2+}

As integrinas α e β são recetores de adesão focal que se ligam à MEC. Estas integrinas ligam-se à Talina, Paxilina e Vinculina e a α -actina é fosforilada por FAK, ligando-se assim à vinculina, aumentando assim os níveis de Ca^{2+} . As mudanças dos níveis de Ca^{2+} podem levar à formação ou não de adesões focais (adaptado de (Prevarskaya, Skryma, & Shuba, 2011).

A remodelação de MEC pelo Ca^{2+} está descrita em múltiplos estudos (Park et al., 2012). Níveis elevados de Ca^{2+} intracelular conduzem a uma maior adesão célula-célula, como resultado da fosforilação da quinase de adesão focal mediada por CAMKII (Easley, 2008). Outros estudos demonstraram que a sinalização de Ca^{2+} induzida por SOCE medeia a montagem de actomiosina e aderências focais, o que é necessário para uma maior migração celular (Y. Chen et al., 2019). A quebra das

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

adesões focais (necessárias à adesão célula-matriz) e a contração da actomiosina, mecanismos responsáveis pela retração da extremidade posterior, são também regulados por sinais dependentes de Ca^{2+} (F. C. Tsai, Kuo, Chang, & Tsai, 2015). Os canais de Ca^{2+} TRPV2 regulam vários modeladores da MEC, nomeadamente MMP1 e MMP9 (Monet et al., 2010). Também os canais STIM1/ORAI1 ativos são capazes de modelar os níveis de membrana de tipo 1-MMP regulando as metástases em melanomas (Jianwei Sun et al., 2014). Do mesmo modo, a expressão forçada de MUC induz a expressão de MMP2 e metástases em modelos de cancro do fígado (Jin et al., 2019). Em contrapartida, em células MDAMB-231, a inibição de MUC reprime a capacidade metastática *in vivo* (Tosatto et al., 2016). A entrada Ca^{2+} por meio do canal VGCC tipo-L é essencial para a migração de fibroblastos (S. Yang & Huang, 2005). Por outro lado, a inibição da atividade de VGCCs conduz a um decréscimo dos níveis de MMP9 (Kato et al., 2007). Do mesmo modo, a inibição de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem Cav1.3 reduz a capacidade de migração de células do cólon (Fourbon et al., 2017). Os canais TRP também desempenham um papel importante na migração celular, nomeadamente níveis elevados destes canais conduzem à perda de adesão celular (Fels, Bulk, Pethő, & Schwab, 2018). Em cancro do ovário, o canal TRPM7 promove a TEM, por meio da ativação da sinalização de PI3K / AKT (L. Liu et al., 2019). Este mesmo canal é capaz de promover a migração celular no cancro da nasofaringe (J. P. Chen et al., 2010). Estudos em células de osteossarcoma, demonstraram uma ligação da migração e polaridade celular com a ativação do recetor TRPC1 (Y. W. Huang et al., 2015). Estes canais em combinação com os ORAI1 podem formar um complexo com o canal KCa de pequena condutância (SK3), o que desempenha um mecanismo fundamental na migração de células da mama (Guéguinou et al., 2016). Este complexo por meio de um mecanismo dependente de SOCE é também responsável pela migração de células de cancro do cólon (Guéguinou et al., 2016). Em vários modelos de cancro, o aumento da atividade do canal TRPV1 conduz a uma maior migração celular (Santoni, Farfariello, & Amantini, 2011). Por outro lado, a inibição do canal da mesma família, TRPV4, conduz a uma redução da resposta migratória ao ácido araquidónico nas células epiteliais da mama (W. H. Lee et al., 2017). A família dos canais STIM está igualmente envolvida na regulação da capacidade de migração celular. Particularmente, o canal STIM1 é capaz de induzir a migração através da ativação de EGF por meio da sinalização de Ca^{2+} (Y. F. Chen et al., 2011). Em células do cancro cervical, este mesmo canal, conduzido por

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

SOCE, é capaz de induzir a migração pela ativação dos reguladores das adesões focais, PYK2 e Calpin (Y. F. Chen et al., 2011). Por outro lado, a inibição da expressão de STIM1 impede rearranjos de actomiosina e fosforilação induzida por EGF (Y. T. Chen et al., 2013).

1.1.4. Indução de metástases e invasão por meio da sinalização de Ca^{2+}

A aquisição de capacidade migratória por parte das células cancerígenas de tumores sólidos permite que estas se disseminem através dos sistemas sanguíneo e linfático e invadam outros tecidos, formando novos tumores. A este comportamento celular damos o nome de metastização. Neste contexto, o Ca^{2+} é um regulador crucial da migração celular, não só na normal fisiologia da migração celular, mas também na disseminação de células malignas por outras regiões do corpo. Na verdade, múltiplos estudos ligam os vários componentes de SOCE em mecanismos importantes na metastização, particularmente a migração e a invasão (Diez-Bello, Jardin, Salido, & Rosado, 2017; Gueguinou et al., 2017; Hammadi et al., 2012; J. H. Kim et al., 2014; N. Yang et al., 2013). Por exemplo, a inibição de SOCE pelo silenciamento de STIM1 e ORAI1 conduz à supressão da motilidade e capacidade de invasão de células cancerosas, como resultado de alterações no comportamento das proteínas de adesão focal (S. Yang, Zhang, & Huang, 2009). Estes canais estão também relacionados com a metastização do cancro da mama, mais concretamente, a inibição de STIM1 e ORAI1 reduz a capacidade invasiva *in vitro* e de metástase *in vivo* (S. Yang et al., 2009). Do mesmo modo, a inibição dos canais STIM e ORAI1 no cancro da mama inibe a metástase pulmonar (Vashisht, Trebak, & Motiani, 2015). A ativação da quinase Src pelos canais STIM1 e ORAI1 auxilia na montagem do precursor de invadopodia em células de cancro de pele (Mo & Yang, 2018). Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L também parecem promover a migração coletiva de células tumorais. O canal MCU, principal responsável pela captação de Ca^{2+} pela mitocôndria, participa ativamente na migração e progressão metastática. Em células do cancro da mama, a inibição de MCU reduz o tamanho dos nódulos linfáticos e das metástases pulmonares (Tosatto et al., 2016). No cancro do fígado, o silenciamento deste canal reduz a capacidade de migração e invasão de células hepatocelulares malignas e a formação de metástases pulmonares (Ren et al., 2017). Por outro lado, o aumento da expressão de MCU

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

parece estar associado à migração e invasão de células tumorais, através da produção elevada de ROS, com consequente ativação de JNK e de MMP-2 (Ren et al., 2017). Também o canal TMBIM/GAAP promove a migração (Carrara et al., 2015) e invasão celular através de um mecanismo dependente de H₂O₂ (Almeida et al., 2020). As proteínas TMBIM6/ BI-1 e TMBIM2/ LFG também afetam os mecanismos celulares que atuam na migração e adesão celular. Particularmente, o incremento de BI-1 e LFG estão associados com o aumento da capacidade metastática das células (G. H. Lee et al., 2010; Planells-Ferrer et al., 2014). A sobreexpressão de TMBIM6 promove a polimerização da actina, induzindo a migração celular (G.-H. Lee et al., 2010). Por outro lado, em células de neuroblastoma, a inibição de TMBIM2 resulta numa baixa adesão e migração celular (Planells-Ferrer et al., 2014). Do mesmo modo, em células humanas do tipo SH-SY5Y, a deleção de TMBIM2 aumenta o potencial metastático e altera a expressão de vários genes envolvidos na adesão e migração celular (Planells-Ferrer et al., 2014). O impacto dos membros TMBIM na motilidade celular apoiam a importância destes na progressão e metástase tumoral.

Capítulo V

Discussão e Conclusão

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

O cancro é a segunda causa de morte mais comum a nível mundial (H. Wang et al., 2016). Esta condição é caracterizada pelo crescimento celular anormal e aquisição de características metastáticas (Sever & Brugge, 2015). O desenvolvimento de cancro, na maioria dos casos, resulta na ativação de oncogenes ou na desativação de supressores tumorais, que conduzem à progressão descontrolada do ciclo celular e à inibição da apoptose (Vogelstein & Kinzler, 2004). A desregulação destes genes pode conduzir à expressão descontrolada de determinadas proteínas, assim como produzir proteínas mutadas cuja atividade é desregulada. Algumas das proteínas que estão envolvidas nas vias de sinalização que são comumente ativadas em muitas respostas fisiológicas, são o EGFR, pequenas GTPases (por exemplo, Ras), serina/ treonina quinases (como o Akt), quinases lipídicas (por exemplo, PI3Ks), assim como as tirosinas quinases citoplasmáticas (como o Src). Componentes das vias de sinalização, como TGF β , FGF, Notch, JNK e ERK/ MAPK também podem ser afetados (Vogelstein & Kinzler, 2004; Vogelstein et al., 2013), assim como os alvos nucleares a jusante das vias de sinalização - por exemplo, fatores de transcrição (tais como o Myc e o NF- κ B), remodeladores da cromatina (como o EZH2) e efetores do ciclo celular (por exemplo, ciclinas). A desregulação desta orquestra de fatores genéticos e de sinalização celular coordenada pode resultar de uma infinidade de mecanismos intrínsecos e fatores microambientais extrínsecos, sendo um deles o Ca²⁺. A sinalização do cálcio (Ca²⁺) desempenha um papel crítico desde o início do tumor até a metástase. No entanto, as transformações singulares na sinalização do ião Ca²⁺ como origem ou resultado do desenvolvimento e progressão tumoral estão menos descritas. O Ca²⁺ parece mesmo desempenhar não só um papel na progressão tumoral, mas também na regulação do microambiente tumoral. A regulação da proliferação, morte celular e invasão e metástase por este ião evidencia múltiplas oportunidades para conduzir e modular a sinalização de Ca²⁺ alterada durante o desenvolvimento tumoral.

Múltiplos estudos apresentados ao longo desta dissertação evidenciam que as mudanças rápidas ou de longo prazo da homeostasia do Ca²⁺ com recurso aos canais, bombas e “exchangers”, promovem o desenvolvimento e progressão tumoral, assim como podem comprometer o seu tratamento. Nomeadamente, a presença dos recetores TRPC, TRPM e TRPV está associada ao crescimento e progressão tumoral (Aydar, Yeo, Djamgoz, & Palmer, 2009; El Hiani, Lehen'kyi, Ouadid-Ahidouch, & Ahidouch, 2009; Ouadid-Ahidouch, Dhennin-Duthille, Gautier, Sevestre, & Ahidouch, 2013; Prevarskaya, Zhang, & Barritt, 2007; S. L. Yang, Cao,

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

Zhou, Feng, & Wang, 2009). Por exemplo, os recetores TRPC1, TRPC6, TRPM7, TRPM8 e TRPV6 estão sobreexpressos em células de cancro da mama (Dhennin-Duthille et al., 2011; Ouadid-Ahidouch et al., 2013). Também o recetor de Ca^{2+} TRPC6 tem um comportamento aberrante em células do cancro esofágico e os TRPM7, 8 e TRPV2, 6 estão relacionados com a progressão do cancro da próstata e (X. Ding, He, Shi, Wang, & Wang, 2010; Gkika & Prevarskaya, 2011; L. Zhang & Barritt, 2006; S. F. Zhang, Chen, Fan, & Ren, 2013). Além disso, a expressão de TRPV6 está associada a um prognóstico agravado do cancro de próstata (Fixemer, Wissenbach, Flockerzi, & Bonkhoff, 2003). Estas características tornam os reguladores do fluxo de cálcio marcador moleculares promissores para um diagnóstico mais específico e personalizado dos vários tipos de cancro.

Vários agentes anticancerígenos conseguem combater as células tumorais através da morte celular comprometendo a viabilidade celular ou através de uma redução da produção de ATP, alterando de forma indireta a sinalização de Ca^{2+} através da indução do influxo deste ião ou alterando os seus gradientes através da célula. Também os agentes que inibem fatores de crescimento que atuam em conjunto com recetores ligados à produção de IP_3 também levarão a um impacto na sinalização de Ca^{2+} citosólico. Na verdade, os reguladores da libertação do Ca^{2+} do RE via IP_3 Rs, os Bcl-2, desempenham um papel importante na regulação da morte de células tumorais, metabolismo e proliferação celular. Em 2013, foi mesmo descrita a interferência direta de um agente anticancerígeno, o 5-fluorouracil (5-FU), na sinalização do Ca^{2+} , em células do cancro do cólon HCT116 (Can, Akpınar, Baran, Zhivotovsky, & Olsson, 2013). A terapia com 5-FU conduz a um aumento em Ca^{2+} citosólico promovendo a ativação de p53 e a apoptose de forma dependente de calmodulina (Can et al., 2013). Também o tratamento com doxorubicina promove alterações nas taxas de recaptção de Ca^{2+} no RE em células de cancro do cólon HCT-116 que expressam p53 (Giorgi et al., 2015). Do mesmo modo, também os agentes proteassoma bortezomibe (Landowski, Megli, Nullmeyer, Lynch, & Dorr, 2005) e tipifarnibe (Yanamandra et al., 2011) atuam de forma dependente Ca^{2+} citoplasmático. Alguns estudos demonstram mesmo que tratamentos prolongados com 5-FU, podem conduzir a alterações aberrantes do SOCE promovendo a resistência aos tratamentos (Kondratska et al., 2014; Sebastian Schmidt et al., 2014). Por outro lado, o tratamento da leucemia linfoblástica aguda com dexametasona promove o influxo de Ca^{2+} conduzindo a um mecanismo de sobrevivência, uma vez que a quelação do Ca^{2+} intracelular promove a sensibilidade

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

de células deste tipo de leucemia à dexametasona (Abdoul-azize, Dubus, & Vannier, 2017). O agente Trifluoperazina, sendo um inibidor da capacidade invasiva das células de glioblastoma, atua através da desinibição de IP3Rs por meio de interações com calmodulina subtipo 2 (Kang et al., 2017). Algumas proteínas responsáveis pela regulação da sinalização de Ca^{2+} intracelular, tais como canais, bombas e “exchangers”, podem prover um meio de controlar vias que são difíceis de serem alvo farmacologicamente. Neste contexto, foi mesmo proposto o uso de inibidores de SERCA em cancros associados a mutações de NOTCH1, de modo a induzir a paragem do ciclo celular e consequente apoptose (Roti et al., 2013).

Para além dos agentes farmacológicos, também a radioterapia amplamente usada no controlo do crescimento de tumores localizados está associada a alterações nos níveis de Ca^{2+} . A radiação pode mesmo promover a entrada de Ca^{2+} mediada por TRPM2 e a paragem do ciclo celular em G2/M em células de leucemia (Klumpp et al., 2016). A radiação ionizante é também capaz de induzir a sinalização de Ca^{2+} via TRPM8 (Klumpp et al., 2017). Ademais, o silenciamento de TRPM8 conduz a efeitos antiproliferativos da radiação ionizante, podendo os inibidores de TRPM8 serem um alvo para reduzir a resistência à radioterapia em glioblastomas (Klumpp et al., 2017). A terapia por eletroporação de Ca^{2+} é outro exemplo da importância deste íão no meio intracelular e das proteínas de transporte de Ca^{2+} no tratamento do cancro (Stine Krog Frandsen et al., 2012). Esta terapia caracteriza-se pela aplicação de um pulso de alta voltagem após injeção de uma solução altamente concentrada de íões de Ca^{2+} no local do tumor, levando à necrose das células cancerosas (Stine K. Frandsen et al., 2017). As células cancerosas são muito mais sensíveis à morte por eletroporação de Ca^{2+} do que as células normais, o que parece resultar do facto das células cancerosas apresentarem um nível mais baixo de bombas de efluxo de cálcio, em relação às células normais (Stine K. Frandsen et al., 2017). Deste modo, as células cancerosas atingem níveis elevados de Ca^{2+} citosólico mais facilmente, o que promove a necrose celular (Stine K. Frandsen et al., 2017). Deste modo, novas terapias que visem a combinação de moduladores farmacológicos dos reguladores dos níveis de Ca^{2+} ou mesmo de proteínas alvo deste íão poderão aumentar a eficácia de uma multiplicidade de terapias contra o cancro. Assim, é necessário um estudo mais profundo dos canais de Ca^{2+} específicos utilizados no desenvolvimento dos gradientes de íão nos vários tipos de tumor, assim como em células sãs, de modo a permitir o desenvolvimento de novas terapias incisivas, capazes de matar células malignas, sem promover dano às restantes células.

Bibliografia

- Abdoul-azize, S., Dubus, I., & Vannier, J. (2017). Improvement of dexamethasone sensitivity by chelation of intracellular Ca²⁺ in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells through the prosurvival kinase ERK1/2 deactivation, *8*(16), 27339–27352.
- Aggarwal, A., Prinz-Wohlgenannt, M., Gröschel, C., Tennakoon, S., Meshcheryakova, A., Chang, W., ... Kállay, E. (2015). The calcium-sensing receptor suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell-like phenotype in the colon. *Molecular Cancer*, *14*(1).
<https://doi.org/10.1186/s12943-015-0330-4>
- Ahmad, I., Iwata, T., & Leung, H. Y. (2012). Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1823*(4), 850–860. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.004>
- Almeida, N., Carrara, G., Palmeira, C. M., Fernandes, A. S., Parsons, M., Smith, G. L., & Saraiva, N. (2020). Stimulation of cell invasion by the Golgi Ion Channel GAAP/TMBIM4 via an H₂O₂-Dependent Mechanism. *Redox Biology*, *28*, 101361. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101361>
- Ambudkar, I. S., Brito de Souza, L., & Ong, H. L. (2018). TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces Indu. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 1570–1573. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0061-4>.
- Archer, S. L. (2013). Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. *New England Journal of Medicine*, *369*(23), 2236–2251. <https://doi.org/10.1056/nejmra1215233>
- Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M., & Palmer, C. (2009). Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: A potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell International*, *9*, 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1475-2867-9-23>
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology*, *1170*, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-888-2_2
- Beech, D. J. (2013). Characteristics of transient receptor potential canonical calcium-permeable channels and their relevance to vascular physiology and disease. *Circulation Journal*, *77*(3), 570–579.
<https://doi.org/10.1253/circj.CJ-13-0154>
- Berridge, M. J. (2005). Unlocking the secrets of cell signaling. *Annual Review of Physiology*, *67*, 1–21.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040103.152647>
- Berridge, M. J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1793*(6), 933–940.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.005>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *1*(1), 11–21.
<https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bhattacharya, A., Kumar, J., Hermanson, K., Sun, Y., Qureshi, H., Perley, D., ...

- Dhasarathy, A. (2018). The calcium channel proteins ORAI3 and STIM1 mediate TGF- β induced Snai1 expression. *Oncotarget*, 9(50), 29468–29483. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25672>
- Biswal, B., Sen, S., & Maka, S. (2019). A structure preserving model order reduction method for calcium homeostatic system. *Mathematical Biosciences*, 312(July 2018), 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2019.03.002>
- Bittremieux, M., Parys, J. B., Pinton, P., & Bultynck, G. (2016). ER functions of oncogenes and tumor suppressors: Modulators of intracellular Ca²⁺ signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1364–1378. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.002>
- Bravo-Sagua, R., Parra, V., López-Crisosto, C., Díaz, P., Quest, A. F. G., & Lavandero, S. (2017). Calcium transport and signaling in mitochondria. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 623–634. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160013>
- Breuksch, I., Weinert, M., & Brenner, W. (2016). The role of extracellular calcium in bone metastasis. *Journal of Bone Oncology*, 5(3), 143–145. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2016.06.004>
- Bublitz, M., Musgaard, M., Poulsen, H., Thøgersen, L., Olesen, C., Schiøtt, B., ... Nissen, P. (2013). Ion pathways in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10759–10765. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.436550>
- Can, G., Akpınar, B., Baran, Y., Zhivotovsky, B., & Olsson, M. (2013). 5-Fluorouracil signaling through a calcium-calmodulin-dependent pathway is required for p53 activation and apoptosis in colon carcinoma cells. *Oncogene*, 32(38), 4529–4538. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.467>
- Cao, Q., Zhong, X. Z., Zou, Y., Murrell-Lagnado, R., Zhu, M. X., & Dong, X. P. (2015). Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *Journal of Cell Biology*, 209(6), 879–894. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409071>
- Capiod, T. (2012). The Need for Calcium Channels in Cell Proliferation. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8(1), 4–17. <https://doi.org/10.2174/15748928130102>
- Carafoli, E., & Krebs, J. (2016). Why calcium? How calcium became the best communicator. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 20849–20857. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.735894>
- Carrara, G., Parsons, M., Saraiva, N., & Smith, G. L. (2017). Golgi anti-apoptotic protein: A tale of camels, calcium, channels and cancer. *Open Biology*, 7(5). <https://doi.org/10.1098/rsob.170045>
- Carrara, G., Saraiva, N., Parsons, M., Byrne, B., Prole, D. L., Taylor, C. W., & Smith, G. L. (2015). Golgi anti-apoptotic proteins are highly conserved ion channels that affect apoptosis and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11785–11801. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637306>
- Carreras-Sureda, A., Pihán, P., & Hetz, C. (2018). Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium*, 70(April 2017), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.004>
- Červinka, M. (1999). The role of mitochondria in apoptosis. *General Physiology and Biophysics*, 18(SPEC. ISS.), 33–40. <https://doi.org/10.1146/annurev->

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- genet-102108-134850.The
- Chami, M., Gozuacik, D., Lagorce, D., Brini, M., Falson, P., Peaucellier, G., ... Paterlini-Bréchet, P. (2001). SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis. *Journal of Cell Biology*, *153*(6), 1301–1313. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1301>
- Chen, J. P., Luan, Y., You, C. X., Chen, X. H., Luo, R. C., & Li, R. (2010). TRPM7 regulates the migration of human nasopharyngeal carcinoma cell by mediating Ca²⁺ influx. *Cell Calcium*, *47*(5), 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.03.003>
- Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, Y. T., Lin, P. Y., Huang, H. J., Chou, C. Y., ... Shen, M. R. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(37), 15225–15230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103315108>
- Chen, Y. T., Chen, Y. F., Chiu, W. T., Wang, Y. K., Chang, H. C., & Shen, M. R. (2013). The ER Ca²⁺ sensor STIM1 regulates actomyosin contractility of migratory cells. *Journal of Cell Science*, *126*(5), 1260–1267. <https://doi.org/10.1242/jcs.121129>
- Chen, Y., Wang, D., Peng, H., Chen, X., Han, X., Yu, J., ... Li, F. (2019). Epigenetically upregulated oncoprotein PLCE1 drives esophageal carcinoma angiogenesis and proliferation via activating the PI-PLCε-NF-κB signaling pathway and VEGF-C/ Bcl-2 expression. *Molecular Cancer*, *18*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0930-x>
- Cicek, F. A., Ozgur, E. O., Ozgur, E., & Ugur, M. (2014). The interplay between plasma membrane and endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPases in agonist-induced temporal Ca²⁺ dynamics. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *46*(6), 503–510. <https://doi.org/10.1007/s10863-014-9587-3>
- Crabtree, G. R. (1999). Generic Signals and Specific Outcomes. *Cell*, *96*(5), 611–614. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80571-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80571-1)
- Das, S., Clézardin, P., Kamel, S., Brazier, M., & Mentaverri, R. (2020). The CaSR in Pathogenesis of Breast Cancer: A New Target for Early Stage Bone Metastases. *Frontiers in Oncology*, *10*(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00069>
- Davis, F. M., Azimi, I., Faville, R. A., Peters, A. A., Jalink, K., Jr, J. W. P., ... Monteith, G. R. (2014). Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent, *33*(18), 2307–2316. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.187>.Induction
- Davis, F. M., Parsonage, M. T., Cabot, P. J., Parat, M. O., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2013). Assessment of gene expression of intracellular calcium channels, pumps and exchangers with epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer cell line. *Cancer Cell International*, *13*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-76>
- Davis, F. M., Peters, A. A., Grice, D. M., Cabot, P. J., Parat, M. O., Roberts-Thomson,

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- S. J., & Monteith, G. R. (2012). Non-stimulated, agonist-stimulated and store-operated Ca^{2+} influx in MDA-MB-468 breast cancer cells and the effect of EGF-induced EMT on calcium entry. *PLoS ONE*, 7(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036923>
- De Stefani, D., Patron, M., & Rizzuto, R. (2014). Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(9), 2006–2011.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.008>
- Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Faouzi, M., Guilbert, A., Brevet, M., Vaudry, D., ... Ouadid-Ahidouch, H. (2011). High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: Correlation with pathological parameters. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(5), 813–822. <https://doi.org/10.1159/000335795>
- Díaz-Soto, G., Rocher, A., García-Rodríguez, C., Núñez, L., & Villalobos, C. (2016). *The Calcium-Sensing Receptor in Health and Disease. International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 327). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.05.004>
- Díaz-Vegas, A. R., Cordova, A., Valladares, D., Llanos, P., Hidalgo, C., Gherardi, G., ... Jaimovich, E. (2018). Mitochondrial calcium increase induced by RyR1 and IP3R channel activation after membrane depolarization regulates skeletal muscle metabolism. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00791>
- Diez-Bello, R., Jardin, I., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2017). Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(6), 1064–1070.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.014>
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., ... Cui, Q. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>
- Ding, X., He, Z., Shi, Y., Wang, Q., & Wang, Y. (2010). Targeting TRPC6 channels in oesophageal carcinoma growth. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(5), 513–527. <https://doi.org/10.1517/14728221003733602>
- Dolman, N. J., & Tepikin, A. V. (2006). Calcium gradients and the Golgi. *Cell Calcium*, 40(5–6), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.012>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Duchen, M. R. (2000). Mitochondria and calcium: From cell signalling to cell death. *Journal of Physiology*, 529(1), 57–68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x>
- Dykens, J. A., & Will, Y. (2007). The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discovery Today*, 12(17–18), 777–785.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.013>
- Easley. (2008). CaMK-II promotes FA turnover and cell motility by inducing tyr

- phosphorylation of FAK and paxillin. *Technology*, 65(8), 662–674.
<https://doi.org/10.1002/cm.20294>.CaMK-II
- El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N., & Capiod, T. (2008). Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology*, 47(6), 2068–2077. <https://doi.org/10.1002/hep.22263>
- El Hiani, Y., Lehen'kyi, V., Ouadid-Ahidouch, H., & Ahidouch, A. (2009). Activation of the calcium-sensing receptor by high calcium induced breast cancer cell proliferation and TRPC1 cation channel over-expression potentially through EGFR pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 486(1), 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.03.010>
- Enfissi, A., Prigent, S., Colosetti, P., & Capiod, T. (2004). The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium*, 36(6), 459–467.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.04.004>
- Evans, J. H., & Falke, J. J. (2007). Ca²⁺ influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41), 16176–16181.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0707719104>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Farfariello, V., Iamshanova, O., Germain, E., Fliniaux, I., & Prevarskaya, N. (2014). Calcium homeostasis in cancer: A focus on senescence. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(9), 1974–1979.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.005>
- Fels, B., Bulk, E., Pethő, Z., & Schwab, A. (2018). The role of TRP channels in the metastatic cascade. *Pharmaceuticals*, 11(2).
<https://doi.org/10.3390/ph11020048>
- Feng, J., Xu, X., Li, B., Brown, E., Farris, A. B., Sun, S., & Yang, J. (2014). Prostate Cancer Metastatic to Bone has Higher Expression of the Calcium-Sensing Receptor (CaSR) than Primary Prostate Cancer. *Receptors & Clinical Investigation*, 1(6), 1–14. <https://doi.org/10.14800/rci.270>
- Feng, S. L., Sun, M. R., Li, T. T., Yin, X., Xu, C. Q., & Sun, Y. H. (2011). Activation of calcium-sensing receptor increases TRPC3 expression in rat cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(2), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.033>
- Finkel, T., Menazza, S., Holmstrom, K. M., Parks, R. J., Liu, J., Sun, J., ... Murphy, E. (2018). The Ins and Outs of Mitochondrial Calcium. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305484>.The
- Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V., & Bonkhoff, H. (2003). Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: A novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*, 22(49), 7858–7861.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206895>
- Flory, M. R., Moser, M. J., Monnat, R. J., & Davis, T. N. (2000). Identification of a

- human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5919–5923.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.5919>
- Fourbon, Y., Guéguinou, M., Félix, R., Constantin, B., Uguen, A., Fromont, G., ... Vandier, C. (2017). Ca²⁺ protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14230-1>
- Frandsen, Stine K., Krüger, M. B., Mangalanathan, U. M., Tramm, T., Mahmood, F., Novak, I., & Gehl, J. (2017). Normal and malignant cells exhibit differential responses to calcium electroporation. *Cancer Research*, 77(16), 4389–4401.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1611>
- Frandsen, Stine Krog, Gissel, H., Hojman, P., Tramm, T., Eriksen, J., & Gehl, J. (2012). Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis. *Cancer Research*, 72(6), 1336–1341.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3782>
- Fukasawa, K. (2007). Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nature Reviews Cancer*, 7(12), 911–924. <https://doi.org/10.1038/nrc2249>
- Gao, S. wei, & Liu, F. (2019). Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 20(6), 467–475.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1900197>
- Giannopoulos, G., Pittas, K., Vrachatis, D. A., Tsoucala, S., Angelidis, C., & Deftereos, S. (2018). The Role of Calcium Handling Mechanisms in Reperfusion Injury. *Current Pharmaceutical Design*, 24(34), 4077–4089.
<https://doi.org/10.2174/1381612825666181120155953>
- Giorgi, C., Bonora, M., Sorrentino, G., Missiroli, S., Poletti, F., Suski, J. M., ... Pinton, P. (2015). P53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), 1779–1784.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1410723112>
- Giussani, M., Triulzi, T., Sozzi, G., & Tagliabue, E. (2019). Tumor Extracellular Matrix Remodeling: New Perspectives as a Circulating Tool in the Diagnosis and Prognosis of Solid Tumors. *Cells*, 8(2), 81.
<https://doi.org/10.3390/cells8020081>
- Gkika, D., & Prevarskaya, N. (2011). TRP channels in prostate cancer: The good, the bad and the ugly? *Asian Journal of Andrology*, 13(5), 673–676.
<https://doi.org/10.1038/aja.2011.18>
- González-Sánchez, P., Satrustegui, J., Palau, F., & Del Arco, A. (2019). Calcium deregulation and mitochondrial bioenergetics in GDAP1-related CMT disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/ijms20020403>
- Gottlieb, T. M., Leal, J. F. M., Seger, R., Taya, Y., & Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 21(8), 1299–1303.
<https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205181>
- Grände, M., Franzen, Å., Karlsson, J. O., Ericson, L. E., Heldin, N. E., & Nilsson, M.

- (2002). Transforming growth factor- β and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *Journal of Cell Science*, 115(22), 4227–4236. <https://doi.org/10.1242/jcs.00091>
- Gray, M. W. (2013). Organelles. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 17(2), 181–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01097-4>
- Grevel, A., Grevel, A., Becker, T., & Becker, T. (2020). Porins as helpers in mitochondrial protein translocation. *Biological Chemistry*, 401(6–7), 699–708. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0438>
- Grimm, C., Butz, E., Chen, C. C., Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2017). From mucopolipidosis type IV to Ebola: TRPML and two-pore channels at the crossroads of endo-lysosomal trafficking and disease. *Cell Calcium*, 67, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.04.003>
- Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., Van Kuppeveld, F. J. M., & Smith, G. L. (2007). A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathogens*, 3(2), 0246–0259. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030017>
- Gueguinou, M., Crottès, D., Chantôme, A., Rapetti-Mauss, R., Potier-Cartereau, M., Clarysse, L., ... Soriani, O. (2017). The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca²⁺ homeostasis. *Oncogene*, 36(25), 3640–3647. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.501>
- Guéguinou, M., Harnois, T., Crottes, D., Uguen, A., Deliot, N., Gambade, A., ... Potier-Cartereau, M. (2016). SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: A novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin. *Oncotarget*, 7(24), 36168–36184. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8786>
- Gurung, I. S., Medina-Gomez, G., Kis, A., Baker, M., Velagapudi, V., Neogi, S. G., ... Huang, C. L. H. (2011). Deletion of the metabolic transcriptional coactivator PGC1 β induces cardiac arrhythmia. *Cardiovascular Research*, 92(1), 29–38. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr155>
- Guse, A. H., & Wolf, I. M. A. (2016). Ca²⁺ microdomains, NAADP and type 1 ryanodine receptor in cell activation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1379–1384. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.014>
- Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P. G., & Rao, A. (2007). Signalling to transcription: Store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium*, 42(2), 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.03.007>
- Hamidi, A., Song, J., Thakur, N., Itoh, S., Marcusson, A., Bergh, A., ... Landström, M. (2017). TGF- β promotes PI3K-AKT signaling and prostate cancer cell migration through the TRAF6-mediated ubiquitylation of p85 α . *Science Signaling*, 10(486), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal4186>
- Hammadi, M., Chopin, V., Matifat, F., Dhennin-Duthille, I., Chasseraud, M., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2012). Human ether à-gogo K +

- channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. *Journal of Cellular Physiology*, 227(12), 3837–3846. <https://doi.org/10.1002/jcp.24095>
- Hanson, C. J., Bootman, M. D., Distelhorst, C. W., Maraldi, T., & Roderick, H. L. (2008). The cellular concentration of Bcl-2 determines its pro- or anti-apoptotic effect. *Cell Calcium*, 44(3), 243–258. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.014>
- Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K., Lin, P., ... Zhu, M. X. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels, 459(7246), 596–600. <https://doi.org/10.1038/nature08030.NAADP>
- Hao, Y., Baker, D., & Dijke, P. Ten. (2019). TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112767>
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Hofer, A. M., & Brown, E. M. (2003). Extracellular calcium sensing and signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 530–538. <https://doi.org/10.1038/nrm1154>
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., & Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7461–7466. <https://doi.org/10.1073/pnas.102596199>
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes and Development*, 17(18), 2205–2232. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>
- Höglinger, D., Haberkant, P., Aguilera-Romero, A., Riezman, H., Porter, F. D., Platt, F. M., ... Schultz, C. (2015). Intracellular sphingosine releases calcium from lysosomes. *ELife*, 4(NOVEMBER2015), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.10616>
- Hoorn, E. J. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.07.001.SERCA>
- Huang, P., Zou, Y., Zhong, X. Z., Cao, Q., Zhao, K., Zhu, M. X., ... Dong, X. P. (2014). P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17658–17667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.552158>
- Huang, Y. W., Chang, S. J., I-Chen Harn, H., Huang, H. T., Lin, H. H., Shen, M. R., ... Chiu, W. T. (2015). Mechanosensitive store-operated calcium entry regulates the formation of cell polarity. *Journal of Cellular Physiology*, 230(9), 2086–2097. <https://doi.org/10.1002/jcp.24936>
- Humeau, J., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Nuñez, L., Villalobos, C., Kroemer, G., & Senovilla, L. (2018). Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium*, 70, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.07.006>
- Iamshanova, O., Fiorio Pla, A., & Prevarskaya, N. (2017). Molecular mechanisms of tumour invasion: regulation by calcium signals. *Journal of Physiology*, 595(10), 3063–3075. <https://doi.org/10.1113/JP272844>

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- Jin, M., Wang, J., Ji, X., Cao, H., Zhu, J., Chen, Y., ... Xing, J. (2019). MCUR1 facilitates epithelial-mesenchymal transition and metastasis via the mitochondrial calcium dependent ROS/Nrf2/Notch pathway in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *38*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1135-x>
- Jung, J., Cho, K., Naji, A. K., Clemons, K. N., Wong, C. O., Villanueva, M., ... Venkatachalam, K. (2019). HRAS-driven cancer cells are vulnerable to TRPML1 inhibition. *EMBO Reports*, *20*(4). <https://doi.org/10.15252/embr.201846685>
- Jung, J., & Venkatachalam, K. (2019). TRPing the homeostatic alarm — Melanoma cells are selectively vulnerable to TRPML1 deletion. *Cell Calcium*, *84*, 102082. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102082>
- Kahl, C. R., & Means, A. R. (2004). Regulation of Cyclin D1/Cdk4 Complexes by Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase I. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(15), 15411–15419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312543200>
- Kang, S., Hong, J., Lee, J. M., Moon, H. E., Jeon, B., Choi, J., ... Kang, S. S. (2017). Trifluoperazine, a well-known antipsychotic, inhibits glioblastoma invasion by binding to calmodulin and disinhibiting calcium release channel IP3R. *Molecular Cancer Therapeutics*, *16*(1), 217–227. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0169-T>
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T., & Iozzo, R. V. (2019). Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biology*, *75–76*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.08.007>
- Kato, Y., Ozawa, S., Tsukuda, M., Kubota, E., Miyazaki, K., St-Pierre, Y., & Hata, R. I. (2007). Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *FEBS Journal*, *274*(12), 3171–3183. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05848.x>
- Kehlet, S. N., Sanz-Pamplona, R., Brix, S., Leeming, D. J., Karsdal, M. A., & Moreno, V. (2016). Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients. *Scientific Reports*, *6*(May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep30599>
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the tumor. *Cell*, *141*(1), 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
- Kim, J. H., Lkhagvadorj, S., Lee, M. R., Hwang, K. H., Chung, H. C., Jung, J. H., ... Eom, M. (2014). Orai1 and STIM1 are critical for cell migration and proliferation of clear cell renal cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *448*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.064>
- Kim, S. A., Inamura, K., Yamauchi, M., Nishihara, R., Mima, K., Sukawa, Y., ... Qian, Z. R. (2016). Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. *British Journal of*

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- Cancer*, 114(2), 199–206. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.347>
- Klumpp, D., Frank, S. C., Klumpp, L., Sezgin, E. C., Eckert, M., Edalat, L., ... Huber, S. M. (2017). TRPM8 is required for survival and radioresistance of glioblastoma cells. *Oncotarget*, 8(56), 95896–95913. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21436>
- Klumpp, D., Misovic, M., Szteyn, K., Shumilina, E., Rudner, J., & Huber, S. M. (2016). Targeting TRPM2 channels impairs radiation-induced cell cycle arrest and fosters cell death of T cell leukemia cells in a Bcl-2-dependent manner. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8026702>
- Koenig, X., Choi, R. H., Schicker, K., Singh, D. P., Hilber, K., & Launikonis, B. S. (2019). Mechanistic insights into store-operated Ca²⁺ entry during excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(7), 1239–1248. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.02.014>
- Kondratska, K., Kondratskyi, A., Yassine, M., Lemonnier, L., Lepage, G., Morabito, A., ... Prevarskaya, N. (2014). Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(10), 2263–2269. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.012>
- Landowski, T. H., Megli, C. J., Nullmeyer, K. D., Lynch, R. M., & Dorr, R. T. (2005). Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of velcade (PS-341/Bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Research*, 65(9), 3828–3836. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3684>
- Lee, G.-H., Ahn, T., Kim, D.-S., Park, S. J., Lee, Y. C., Yoo, W. H., ... Chae, H.-J. (2010). Bax Inhibitor 1 Increases Cell Adhesion through Actin Polymerization: Involvement of Calcium and Actin Binding. *Molecular and Cellular Biology*, 30(7), 1800–1813. <https://doi.org/10.1128/mcb.01357-09>
- Lee, G. H., Yan, C., Shin, S. J., Hong, S. C., Ahn, T., Moon, A., ... Chae, H. J. (2010). BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: The alteration of mitochondrial function. *Oncogene*, 29(14), 2130–2141. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.491>
- Lee, J. M., Davis, F. M., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2011). Ion channels and transporters in cancer. 4. remodeling of Ca²⁺ signaling in tumorigenesis: Role of Ca²⁺ transport. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 301(5). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00136.2011>
- Lee, K. P., Choi, S., Hong, J. H., Ahuja, M., Graham, S., Ma, R., ... Yuan, J. P. (2014). Molecular determinants mediating gating of transient receptor potential canonical (TRPC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Journal of Biological Chemistry*, 289(10), 6372–6382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546556>
- Lee, W. H., Choong, L. Y., Jin, T. H., Mon, N. N., Chong, S., Liew, C. S., ... Lim, Y. P. (2017). TRPV4 plays a role in breast cancer cell migration via Ca²⁺-dependent activation of AKT and downregulation of E-cadherin cell cortex protein. *Oncogenesis*, 6(5), e338–e338.

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.39>
- Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca²⁺/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*, *26*(52), 7380–7385. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210545>
- Li, J., Ahat, E., & Wang, Y. (2019). *Golgi structure and function in health, stress, and diseases. Results and Problems in Cell Differentiation* (Vol. 67). https://doi.org/10.1007/978-3-030-23173-6_19
- Liu, J., Chen, Y., Shuai, S., Ding, D., Li, R., & Luo, R. (2014). TRPM8 promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating EMT via activating AKT/GSK-3 β pathway. *Tumor Biology*, *35*(9), 8969–8977. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2077-8>
- Liu, L., Wu, N., Wang, Y., Zhang, X., Xia, B., Tang, J., ... Wang, J. (2019). TRPM7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer through the calcium-related PI3K / AKT oncogenic signaling. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *38*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1061-y>
- Majewski, L., & Kuznicki, J. (2014). SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(9), 1940–1952. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.019>
- Marcello, M., & White, M. R. H. (2010). Spatial and temporal information coding and noise in the NF- κ B system. *Biochemical Society Transactions*, *38*(5), 1247–1250. <https://doi.org/10.1042/BST0381247>
- McLaughlin, A. P., & De Vries, G. W. (2001). Role of PLC γ and Ca²⁺ in VEGF- and FGF-induced choroidal endothelial cell proliferation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *281*(5 50-5), 1448–1456. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.5.c1448>
- Medina, D. L., & Ballabio, A. (2015). Lysosomal calcium regulates autophagy. *Autophagy*, *11*(6), 970–971. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1047130>
- Medina, D. L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., ... Ballabio, A. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature Cell Biology*, *17*(3), 288–299. <https://doi.org/10.1038/ncb3114>
- Meier, P., & Vousden, K. H. (2007). Lucifer's Labyrinth-Ten Years of Path Finding in Cell Death. *Molecular Cell*, *28*(5), 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.016>
- Miao, Y., Shen, Q., Zhang, S., Huang, H., Meng, X., Zheng, X., ... Zou, F. (2019). Calcium-sensing stromal interaction molecule 2 upregulates nuclear factor of activated T cells 1 and transforming growth factor- β signaling to promote breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research*, *21*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1185-1>
- Micaroni, M., Perinetti, G., Di Giandomenico, D., Bianchi, K., Spaar, A., & Mironov, A. A. (2010). Synchronous intra-Golgi transport induces the release of Ca²⁺ from the Golgi apparatus. *Experimental Cell Research*, *316*(13), 2071–2086. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.024>
- Mittal, V. (2018). Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis.

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13, 395–412.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043854>
- Mo, Pi., & Yang, S. (2018). The Store-Operated Calcium Channels in Cancer Metastasis: from Cell Migration, Invasion to Metastatic Colonization. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. Retrieved from file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
- Monet, M., Lehen'kyi, V., Gackiere, F., Firlej, V., Vandenberghe, M., Roudbaraki, M., ... Prevarskaya, N. (2010). Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Research*, 70(3), 1225–1235. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2205>
- Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., & Roberts-Thomson, S. J. (2007). Calcium and cancer: Targeting Ca²⁺ transport. *Nature Reviews Cancer*, 7(7), 519–530. <https://doi.org/10.1038/nrc2171>
- Morciano, G., Marchi, S., Morganti, C., Sbano, L., Bittremieux, M., Kerkhofs, M., ... Pinton, P. (2018). Role of Mitochondria-Associated ER Membranes in Calcium Regulation in Cancer-Specific Settings. *Neoplasia (United States)*, 20(5), 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.03.005>
- Morelli, M. B., Nabissi, M., Amantini, C., Tomassoni, D., Rossi, F., Cardinali, C., ... Santoni, G. (2016). Overexpression of transient receptor potential mucolipin-2 ion channels in gliomas: Role in tumor growth and progression. *Oncotarget*, 7(28), 43654–43668. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9661>
- Nosedá, M., McLean, G., Niessen, K., Chang, L., Pollet, I., Montpetit, R., ... Karsan, A. (2004). Notch Activation Results in Phenotypic and Functional Changes Consistent with Endothelial-to-Mesenchymal Transformation. *Circulation Research*, 94(7), 910–917. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000124300.76171.C9>
- Ortega, S., Malumbres, M., & Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1602(1), 73–87. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(02\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(02)00037-9)
- Ouadid-Ahidouch, H., Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Sevestre, H., & Ahidouch, A. (2013). TRP channels: Diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer? *Trends in Molecular Medicine*, 19(2), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.11.004>
- Palty, R., Silverman, W. F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., ... Sekler, I. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 436–441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908099107>
- Pande, G., Anil Kumar, N., & Manogaran, P. S. (1996). Flow cytometric study of changes in the intracellular free calcium during the cell cycle. *Cytometry*, 24(1), 55–63. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960501\)24:1<55::AID-CYTO7>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960501)24:1<55::AID-CYTO7>3.0.CO;2-H)
- Park, R., Ping, L., Song, J., Hong, S. Y., Choi, T. Y., Choi, J. R., ... Lord, S. T. (2012).

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- Fibrinogen residue γ Ala341 is necessary for calcium binding and “A-a” interactions. *Thrombosis and Haemostasis*, 107(5), 875–883.
<https://doi.org/10.1160/TH11-10-0731>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, 29(3), 212–226.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Paupe, V., & Prudent, J. (2017). Biochemical and Biophysical Research Communications New insights into the role of mitochondrial calcium homeostasis in cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.039>
- Periasamy, M., Maurya, S. K., Sahoo, S. K., Singh, S., Reis, F. C. G., & Bal, N. C. (2017). Role of SERCA pump in muscle thermogenesis and metabolism. *Comprehensive Physiology*, 7(3), 879–890.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160030>
- Pinton, P., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal*, 17(18), 5298–5308.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5298>
- Pitt, S. J., Funnell, T. M., Sitsapesan, M., Venturi, E., Rietdorf, K., Ruas, M., ... Sitsapesan, R. (2010). TPC2 is a novel NAADP-sensitive Ca^{2+} release channel, operating as a dual sensor of luminal pH and Ca^{2+} . *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 35039–35046.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.156927>
- Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P., & Pozzan, T. (2011). Ca^{2+} signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium*, 50(2), 184–192.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.006>
- Planells-Ferrer, L., Urresti, J., Soriano, A., Reix, S., Murphy, D. M., Ferreres, J. C., ... Comella, J. X. (2014). MYCN repression of Lifeguard/FAIM2 enhances neuroblastoma aggressiveness. *Cell Death and Disease*, 5(9).
<https://doi.org/10.1038/cddis.2014.356>
- Prevarskaya, N., Ouadid-Ahidouch, H., Skryma, R., & Shuba, Y. (2014). Remodelling of Ca^{2+} transport in cancer: How it contributes to cancer hallmarks? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638), 1–10. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0097>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: New roles for known actors. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 609–618.
<https://doi.org/10.1038/nrc3105>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2013). Targeting Ca^{2+} transport in cancer: Close reality or long perspective? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(3), 225–241. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.741594>
- Prevarskaya, N., Zhang, L., & Barritt, G. (2007). TRP channels in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772(8), 937–946.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.05.006>
- Prins, D., & Michalak, M. (2011). Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), 1–16.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004069>
- Pu, F., Chen, N., & Xue, S. (2016). Calcium intake , calcium homeostasis and

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- health. *Food Science and Human Wellness*, 5(1), 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.01.001>
- Putney, J. W. (2005). *Calcium signaling. Calcium Signaling, Second Edition*.
<https://doi.org/10.1201/9781420038231>
- Qureshi, O. S., Paramasivam, A., Yu, J. C. H., & Murrell-Lagnado, R. D. (2007). Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *Journal of Cell Science*, 120(21), 3838–3849.
<https://doi.org/10.1242/jcs.010348>
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., & Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling : Interplay between Endoplasmic Reticulum ., *Trends in Biochemical Sciences*, 41(12), 1035–1049.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.001>
- Rasmussen, C. D., & Means, A. R. (1989). Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO Journal*, 8(1), 73–82.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03350.x>
- Regulation, C., Paola, S. Di, & Medina, D. L. (n.d.). Calcium Signalling Churchill.pdf, 1925, 145–155. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9018-4>
- Ren, T., Zhang, H., Wang, J., Zhu, J., Jin, M., Wu, Y., ... Xing, J. (2017). MCU-dependent mitochondrial Ca²⁺ inhibits NAD⁺/SIRT3/SOD2 pathway to promote ROS production and metastasis of HCC cells. *Oncogene*, 36(42), 5897–5909. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.167>
- Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational Oncology*, 13(6), 100773.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>
- Roche, J. (2018). The epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cancers*, 10(2), 10–13. <https://doi.org/10.3390/cancers10020052>
- Roderick, H. L., & Cook, S. J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: Remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 361–375. <https://doi.org/10.1038/nrc2374>
- Rodríguez, M. A., Martínez-Higuera, A., Valle-Solis, M. I., Hernandez-Alejandro, M., Chávez-Munguía, B., Figueroa-Gutiérrez, A. H., & Salas-Casas, A. (2018). A putative calcium-ATPase of the secretory pathway family may regulate calcium/manganese levels in the Golgi apparatus of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research*, 117(11), 3381–3389.
<https://doi.org/10.1007/s00436-018-6030-4>
- Rossi, A., Pizzo, P., & Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(7), 1068–1078.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>
- Rossini, M., Pizzo, P., & Filadi, R. (2020). Better to keep in touch: investigating inter-organelle cross-talk. *FEBS Journal*, 1–16.
<https://doi.org/10.1111/febs.15451>
- Roti, G., Carlton, A., Ross, K. N., Markstein, M., Pajcini, K., Su, A. H., ... Stegmaier, K. (2013). Complementary genomic screens identify SERCA as a therapeutic target in NOTCH1 mutated cancer. *Cancer Cell*, 23(3), 390–405.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.015>
- Rowland, A. A., & Voeltz, G. K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria

- contacts: Function of the junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 607–615. <https://doi.org/10.1038/nrm3440>
- Ryu, S.-Y., Beutner, G., Dirksen, R. T., Kinnally, K. W., & Sheu, S.-S. (2011). Mitochondrial Ryanodine Receptors and Other Mitochondrial, 584(10), 1948–1955. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.032>
- Saftig, P., & Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(9), 623–635. <https://doi.org/10.1038/nrm2745>
- Saha, D., Datta, P. K., Sheng, H., Morrow, J. D., Wada, M., Moses, H. L., & Beauchamp, R. D. (1999). Synergistic Induction of Cyclooxygenase-2 by Transforming Growth Factor- β 1 and Epidermal Growth Factor Inhibits Apoptosis in Epithelial Cells. *Neoplasia*, 1(6), 508–517. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900051>
- Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L., & Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6392–6397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802047105>
- Santibañez, J. F. (2006). JNK mediates TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Letters*, 580(22), 5385–5391. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.003>
- Santoni, G., Farfariello, V., & Amantini, C. (2011). TRPV channels in tumor growth and progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 704, 947–967. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_49
- Saraiva, N., Prole, D. L., Carrara, G., Johnson, B. F., Taylor, C. W., Parsons, M., & Smith, G. L. (2013). HGAAP promotes cell adhesion and migration via the stimulation of store-operated ca^{2+} entry and calpain 2. *Journal of Cell Biology*, 202(4), 699–713. <https://doi.org/10.1083/jcb.201301016>
- Schmidt, Samuel, & Friedl, P. (2010). Interstitial cell migration: Integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 83–92. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0892-9>
- Schmidt, Sebastian, Liu, G., Liu, G., Yang, W., Honisch, S., Pantelakos, S., ... Lang, F. (2014). Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca^{2+} entry in therapy resistant ovary carcinoma cells. *Oncotarget*, 5(13), 4799–4810. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2035>
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>
- Shang, S., Zhu, F., Liu, B., Chai, Z., Wu, Q., Hu, M., ... Zhou, Z. (2016). Intracellular trpa1 mediates ca^{2+} release from lysosomes in dorsal root ganglion neurons. *Journal of Cell Biology*, 215(3), 369–381. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603081>
- Shim, A. H. R., Tirado-Lee, L., & Prakriya, M. (2015). Structural and functional mechanisms of CRAC channel regulation. *Journal of Molecular Biology*, 427(1), 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.021>

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., & Gill, D. L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers, *13*(October), 549–565. <https://doi.org/10.1038/nrm3414>.STIM
- Sobradillo, D., Hernández-Morales, M., Ubierna, D., Moyer, M. P., Núñez, L., & Villalobos, C. (2014). A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(42), 28765–28782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581678>
- Stanaway, J. D., Afshin, A., Gakidou, E., Lim, S. S., Abate, D., Abate, K. H., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Stu. *The Lancet*, *392*(10159), 1923–1994. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32225-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32225-6)
- Stewart, T. A., Azimi, I., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2015). A role for calcium in the regulation of ATP-binding cassette, sub-family C, member 3 (ABCC3) gene expression in a model of epidermal growth factor-mediated breast cancer epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *458*(3), 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.141>
- Storch, U., Forst, A. L., Philipp, M., Gudermann, T., & Mederos Y Schnitzler, M. (2012). Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(5), 3530–3540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.283218>
- Sun, Jianwei, Lu, F., He, H., Shen, J., Messina, J., Mathew, R., ... Yang, S. (2014). STIM1- and Orai1-mediated Ca²⁺ oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *Journal of Cell Biology*, *207*(4), 535–548. <https://doi.org/10.1083/jcb.201407082>
- Sun, Jingjing, & Stathopoulos, A. (2018). Fgf controls epithelial-mesenchymal transitions during gastrulation by regulating cell division and apicobasal polarity. *Development (Cambridge)*, *145*(19). <https://doi.org/10.1242/dev.161927>
- Sun, Z., Guo, S. S., & Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction, *215*(4).
- Takasuga, S., & Sasaki, T. (2008). [Phosphoinositides in membrane traffic]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, *53*(16 Suppl), 2084–2088.
- Takuwa, N., Zhou, W., Kumada, M., & Takuwa, Y. (1993). Ca²⁺-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(1), 138–145. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)54125-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)54125-9)
- Tennakoon, S., Aggarwal, A., & Kállay, E. (2016). The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1863*(6), 1398–1407. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.017>

- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., ... Prevarskaya, N. (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Research*, *66*(4), 2038–2047. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0376>
- Tian, X., Gala, U., Zhang, Y., Shang, W., Nagarkar Jaiswal, S., di Ronza, A., ... Tong, C. (2015). A Voltage-Gated Calcium Channel Regulates Lysosomal Fusion with Endosomes and Autophagosomes and Is Required for Neuronal Homeostasis. *PLoS Biology*, *13*(3), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002103>
- Tosatto, A., Sommaggio, R., Kummerow, C., Bentham, R. B., Blacker, T. S., Berecz, T., ... Mammucari, C. (2016). The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer progression via HIF-1 α . *EMBO Molecular Medicine*, *8*(5), 569–585. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606255>
- Toyota, M., Ho, C., Ohe-Toyota, M., Baylin, S. B., & Issa, J. P. J. (1999). Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Research*, *59*(18), 4535–4541.
- Tsai, F.-C., & Meyer, T. (2012). Ca²⁺ pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.037>
- Tsai, F. C., Kuo, G. H., Chang, S. W., & Tsai, P. J. (2015). Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. *BioMed Research International*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/409245>
- Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, *10*(2), 116–129. <https://doi.org/10.1038/nrc2780>
- Understanding, G., Harvard, L. A., Susin, S. A., Lorenzo, H. K., & Zamzami, N. (1999). Susin_AIF_1999, *353*, 441–446.
- Uttamsingh, S., Bao, X., Nguyen, K. T., Bhanot, M., Gong, J., Chan, J. L. K., ... Wang, L. H. (2008). Synergistic effect between EGF and TGF- β 1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. *Oncogene*, *27*(18), 2626–2634. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210915>
- Van Abel, M., Hoenderop, J. G. J., & Bindels, R. J. M. (2005). The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: Regulation and implications for disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *371*(4), 295–306. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-1021-2>
- Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Parys, J. B., De Smedt, H., Van Baelen, K., Callewaert, G., ... Missiaen, L. (2004). Inositol trisphosphate producing agonists do not mobilize the thapsigargin-insensitive part of the endoplasmic-reticulum and Golgi Ca²⁺ store. *Cell Calcium*, *35*(2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.08.003>
- Vashisht, A., Trebak, M., & Motiani, R. K. (2015). STIM and orai proteins as novel targets for cancer therapy. A review in the theme: Cell and molecular processes in cancer metastasis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *309*(7), C457–C469. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00064.2015>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Jr., L. A. D., & Kinzler, K. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, 233(4770), 1246. <https://doi.org/10.1126/science.233.4770.1246-b>
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R. M., Carter, A., Casey, D. C., ... Zuhlke, L. J. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1459–1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1)
- Wang, Huabo, Ramakrishnan, A., Fletcher, S., Prochownik, E. V., & Genetics, M. (2014). A 40 kDa protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature10230.A>
- Wang, W., Zhang, X., Gao, Q., Lawas, M., Yu, L., Cheng, X., ... Xu, H. (2017). A voltage-dependent K⁺ channel in the lysosome is required for refilling lysosomal Ca²⁺ stores. *Journal of Cell Biology*, 216(6), 1715–1730. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612123>
- Wen, L., Liang, C., Chen, E., Chen, W., Liang, F., Zhi, X., ... Liang, T. (2016). Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent. *Scientific Reports*, 6(August 2015), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep23269>
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., & Missiaen, L. (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, 32(5–6), 279–305. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001847>
- Xiang, M., Mohamalawari, D., & Rao, R. (2005). A novel isoform of the secretory pathway Ca²⁺,Mn²⁺-ATPase, hSPCA2, has unusual properties and is expressed in the brain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11608–11614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413116200>
- Xie, L., Law, B. K., Chytil, A. M., Brown, K. A., Aakre, M. E., & Moses, H. L. (2004). Activation of the Erk pathway is required for TGF-β1-induced EMT in vitro. *Neoplasia*, 6(5), 603–610. <https://doi.org/10.1593/neo.04241>
- Xiong, J., & X. Zhu, M. (2016). Regulation of lysosomal ion homeostasis by channels and transporters. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5090-x.Regulation>
- Xiping Cheng, Dongbiao Shen, Mohammad Samie, and H. X. (2010). Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 Channels. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Xu, H., & Ren, D. (2017). Lysosomal Physiology. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071649.Lysosomal>
- Xu, M., Almasi, S., Yang, Y., Yan, C., Sterea, A. M., Rizvi Syeda, A. K., ... Dong, X. P. (2019). The lysosomal TRPML1 channel regulates triple negative breast cancer development by promoting mTORC1 and purinergic signaling pathways. *Cell Calcium*, 79(February), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.02.010>
- Xu, M. M., Seas, A., Kiyani, M., Ji, K. S. Y., & Bell, H. N. (2018). A temporal

IMPACTO DO CÁLCIO NA MOTILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

- examination of calcium signaling in cancer- from tumorigenesis, to immune evasion, and metastasis. *Cell and Bioscience*, 8(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s13578-018-0223-5>
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., & Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5 SPEC. ISS.), 559–564.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.002>
- Yanamandra, N., Buzzeo, R. W., Gabriel, M., Hazlehurst, L. A., Mari, Y., Beaupre, D. M., & Cuevas, J. (2011). Tipifarnib-induced apoptosis in acute myeloid leukemia and multiple myeloma cells depends on Ca²⁺ influx through plasma membrane Ca²⁺ channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(3), 636–643.
<https://doi.org/10.1124/jpet.110.172809>
- Yang, J., Zhao, Z., Gu, M., Feng, X., & Xu, H. (2019). Release and uptake mechanisms of vesicular Ca²⁺ stores. *Protein and Cell*, 10(1), 8–19.
<https://doi.org/10.1007/s13238-018-0523-x>
- Yang, N., Tang, Y., Wang, F., Zhang, H., Xu, D., Shen, Y., ... Yang, G. (2013). Blockade of store-operated Ca²⁺ entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Letters*, 330(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.040>
- Yang, S., & Huang, X. Y. (2005). Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 27130–27137.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M501625200>
- Yang, S. L., Cao, Q., Zhou, K. C., Feng, Y. J., & Wang, Y. Z. (2009). Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene*, 28(10), 1320–1328.
<https://doi.org/10.1038/onc.2008.475>
- Yang, S., Zhang, J. J., & Huang, X. Y. (2009). Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis. *Cancer Cell*, 15(2), 124–134.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.019>
- Yang, Z., Kirton, H. M., MacDougall, D. A., Boyle, J. P., Deuchars, J., Frater, B., ... Steele, D. S. (2015). The Golgi apparatus is a functionally distinct Ca²⁺ store regulated by the PKA and Epac branches of the b1-adrenergic signaling pathway. *Science Signaling*, 8(398).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa7677>
- Yao, K., Ye, P. P., Tan, J., Tang, X. J., & Shen Tu, X. C. (2008). Involvement of PI3K/Akt pathway in TGF-β₂-mediated epithelial mesenchymal transition in human lens epithelial cells. *Ophthalmic Research*, 40(2), 69–76.
<https://doi.org/10.1159/000113884>
- Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., ... Yanagi, S. (2009). Human Golgi Antiapoptotic Protein Modulates Intracellular Calcium Fluxes. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 4524–4530.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Zeilhofer, U. (2007). Voltage-gated calcium channels. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60392-7>
- Zhang, C., Miller, C. L., Brown, E. M., & Yang, J. J. (2015). The calcium sensing

- receptor: from calcium sensing to signaling. *Science China Life Sciences*, 58(1), 14–27. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4779-y>
- Zhang, L., & Barritt, G. J. (2006). TRPM8 in prostate cancer cells: A potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocrine-Related Cancer*, 13(1), 27–38. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01093>
- Zhang, S. F., Chen, X. K., Fan, J. X., & Ren, A. M. (2013). Charge transport properties in a series of five-ring-fused thienoacenes: A quantum chemistry and molecular mechanic study. *Organic Electronics*, 14(2), 607–620. <https://doi.org/10.1016/j.orgel.2012.12.001>
- Zhang, X., Yu, L., & Xu, H. (2016). Lysosome calcium in ROS regulation of autophagy. *Autophagy*, 12(10), 1954–1955. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1212787>
- Zhong, T., Pan, X., Wang, J., Yang, B., & Ding, L. (2019). The regulatory roles of calcium channels in tumors. *Biochemical Pharmacology*, 169(June). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.08.005>