

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM EM ONCOLOGIA

SUSANE KARINE KERCKOFF MACHADO

**ANÁLISE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS DE MULHERES COM
CÂNCER DE MAMA**

CHAPECÓ

2023

SUSANE KARINE KERCKOFF MACHADO

**ANÁLISE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS DE MULHERES COM
CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Especialização em Enfermagem em Oncologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de especialista.

Orientador: Prof. Dra. Débora Tavares de Resende e Silva

CHAPECÓ

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Machado, Susane Karine Kerckoff
ANÁLISE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS DE
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA / Susane Karine Kerckoff
Machado. -- 2023.
43 f.:il.

Orientadora: Doutora Débora Tavares de Resende e
Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Especialização em Enfermagem em Oncologia, Chapecó, SC,
2023.

1. Sistema Purinérgico. 2. Câncer de mama. 3.
Plaquetas. 4. Ectonucleotidases. I. Silva, Débora
Tavares de Resende e, orient. II. Universidade Federal
da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SUSANE KARINE KERCKOFF MACHADO

**ANÁLISE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS DE MULHERES COM
CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Especialização em Enfermagem em Oncologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de especialista.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em: 24/02/2023

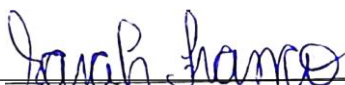
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Débora Tavares de Resende e Silva – UFFS
Orientadora



Prof.^a Dr.^a Carla Augusta – UDESC
Avaliadora



Prof.^a Dr.^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel – UFFS
Avaliadora

RESUMO

O câncer de mama (CM) é o mais incidente em mulheres no mundo e a causa mais frequente de morte por câncer nessa população. No Brasil, estima-se que para 2023 sejam diagnosticados 73.610 casos novos. A região sul é a quarta do país em risco para o desenvolvimento de CM. O CM é uma doença de múltiplos fatores e possui capacidade de invasão de outros tecidos. O sistema purinérgico pode estar relacionado ao desenvolvimento e progressão tumoral, bem como às disfunções na agregação plaquetária. O objetivo foi avaliar a atividade das ectonucleotidases em plaquetas de mulheres com câncer de mama (CM) em comparação com mulheres saudáveis. Trata-se de estudo transversal, de análise quantitativa, com grupos de caso e controle. Os pacientes foram selecionados juntamente com o médico cirurgião diretamente no serviço público de referência para tratamento oncológico da região oeste de Santa Catarina, Associação Hospitalar Lenoir Vargas Ferreira – Hospital Regional do Oeste, antes do procedimento cirúrgico para retirada do tumor. Foi realizada uma abordagem pessoalmente com os pacientes, para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os indivíduos saudáveis (controles) foram selecionados através de uma busca ativa com base nos critérios de inclusão e exclusão e pareamento por idade. Foram avaliadas a atividade enzimática das ectonucleotidases do sistema purinérgico (CD39, CD73, adenosina deaminase - ADA). Conforme os resultados apontam, foi observado diferença significativa da hidrólise de Adenosina Trifosfato (ATP) e Adenosina Difosfato (ADP) entre pacientes e controles, que está diminuída nos pacientes. A hidrólise de Adenosina Monofosfato (AMP) demonstrou resultado não significativo estatisticamente quando comparado pacientes e indivíduos controle. Em relação à atividade da ADA, os achados não foram significativos. Em conclusão, os resultados revelaram que as atividades de ENTPDase e E-ADA estão alteradas nas plaquetas de pacientes com CM, sugerindo que a sinalização purinérgica pode estar envolvida na tromborregulação do CM. A diminuição da atividade da E-NTPDase pode ser indício de redução da reatividade plaquetária nesses pacientes. Além disso, a menor capacidade de ativação e agregação plaquetária pode estar relacionada ao aumento da concentração de adenosina.

Palavras-chave: Sistema purinérgico. Plaquetas. Câncer de mama. Ectonucleotidases.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer in women worldwide and the most frequent cause of death from cancer in this population. In Brazil, it is estimated that for 2023 73,610 new cases will be diagnosed. The southern region is the fourth in the country at risk for the development of BC. BC is a multifactorial disease and has the ability to invade other tissues. The purinergic system may be related to tumor development and progression, as well as dysfunctions in platelet aggregation. The objective was to evaluate the activity of ectonucleotidases in platelets of women with breast cancer (BC) in comparison with healthy women. This is a cross-sectional study, with quantitative analysis, with case and control groups. The patients were selected together with the surgeon directly at the public reference service for oncological treatment in the western region of Santa Catarina, Associação Hospitalar Lenoir Vargas Ferreira – Hospital Regional do Oeste, before the surgical procedure to remove the tumor. A personal approach was carried out with the patients, for the signing of the Free and Informed Consent Form. Healthy subjects (controls) were selected through an active search based on inclusion and exclusion criteria and age matching. The enzymatic activity of the purinergic system ectonucleotidases (CD39, CD73, adenosine deaminase - ADA) was evaluated. As the results point out, a significant difference in the hydrolysis of Adenosine Triphosphate (ATP) and Adenosine Diphosphate (ADP) was observed between patients and controls, which is reduced in patients. The hydrolysis of Adenosine Monophosphate (AMP) showed a statistically non-significant result when comparing patients and control individuals. Regarding ADA activity, the findings were not significant. In conclusion, the results revealed that ENTPDase and E-ADA activities are altered in platelets from patients with CM, suggesting that purinergic signaling may be involved in CM thromboregulation. Decreased E-NTPDase activity may be an indication of reduced platelet reactivity in these patients. In addition, the lower capacity for platelet activation and aggregation may be related to the increase in adenosine concentration..

Keywords: Purinergic system. Platelets. Breast cancer. Ectonucleotidases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina.....	21
Figura 2 – Hidrólise de ATP em plaquetas de indivíduos controle e com câncer de mama não tratado	30
Figura 3 – Hidrólise de ADP em plaquetas de indivíduos controle e com câncer de mama não tratado	30
Figura 4 – Hidrólise de AMP em plaquetas de indivíduos controle e com câncer de mama não tratado	31
Figura 5 – Atividade da ADA em plaquetas de indivíduos controle e com câncer de mama não tratado	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização geral, histológica, imunohistoquímica e metástases da amostra ... 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA - Adenosina Deaminase

Ado - Adenosina

ADP - Difosfato de adenosina

AURA - Aurora Kinase A

AMP - Monofosfato de adenosina

ATP - Trifosfato de Adenosina

CD39 - Ectonucleosideo trifosfato difosfohidrolase 1

CD73 - Ecto-5'-nucleotidase

CM – Câncer de mama

ER - Receptor de estrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

HER2 - Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2

IHC - Imuno-histoquímica

Ki67 - Marcador imunoistoquímico do câncer

OMS - Organização Mundial da Saúde

PR - Receptor de progesterona

TEV - Tromboembolismo Venoso.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	TEMA.....	13
1.2	PROBLEMA	13
1.3	HIPÓTESE	13
1.4	JUSTIFICATIVA.....	14
1.5	OBJETIVOS.....	14
1.5.1	Objetivo geral	14
1.5.2	Objetivos específicos	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	125
2.1	O CÂNCER DE MAMA	15
2.1.1	Classificação do câncer de mama	16
2.2	O SISTEMA PURINÉRGICO	17
2.2.1	O sistema purinérgico no câncer de mama.....	19
2.2.2	O sistema purinérgico em plaquetas no câncer de mama	19
3	METODOLOGIA	23
3.1	TIPO DE ESTUDO	23
3.2	LOCAL DE ESTUDO	23
3.3	AMOSTRA	23
3.3.1	Critério de inclusão e exclusão.....	23
3.4	COLETA DE DADOS	24
3.4.1	Coleta de material biológico	24
3.4.2	Processamento do material biológico	24
3.4.3	Separação das amostras.....	24
3.4.4	Análise do material biológico	25
3.4.4.1	<i>Dosagem das proteínas por BRADFORD.....</i>	25
3.4.4.2	<i>Determinação da atividade de E-NTPDase e E-5'-NT.....</i>	25
3.4.4.3	<i>Determinação da E-ADA</i>	26
3.4.5	Análise dos prontuários	26
3.4.6	Análise estatística	26
3.4.7	Aspectos éticos	27
4	RESULTADOS.....	28

4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	28
4.2	PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICO	29
4	DISCUSSÕES.....	32
6	CONCLUSÕES	34
7	REFERÊNCIAS	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é o mais incidente em mulheres no mundo e a causa mais frequente de morte por câncer nessa população (WHO, 2020). De acordo com estimativa da International Agency for Research on Cancer (IARC), em 2040 serão computados mais de três milhões de novos casos e cerca de 900.000 mortes por câncer de mama.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se que para 2023 sejam diagnosticados 73.610 casos novos, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 41,89 casos por 100 mil mulheres. A região sul é a quarta do país em risco para o desenvolvimento de CM com uma taxa de 41,06 casos para cada 100 mil mulheres. (INCA, 2022).

O CM é uma doença de múltiplos fatores, que podem ser ambientais e genéticos. Tem por característica a multiplicação anormal de células nos diferentes tecidos da mama. Possui capacidade de invasão de outros tecidos, denominada metástase, esse fenômeno geralmente inicia pela via linfática e encontra outros tecidos do corpo (SCULLY et al., 2012).

O sistema purinérgico (SP), por sua vez, é conceituado como uma via de regulação da homeostase imunológica através de diversas moléculas e receptores, com destaque à produção de quimiocinas, citocinas e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (ANTONIOLI et al., 2019). O sistema descoberto na década de 70 possui relação com diversas neoplasias, inclusive o CM.

A adenosina trifosfato (ATP) é uma das moléculas sinalizadoras mais importantes do SP, pois atua como um sinal de alerta, ativando as células imunes para combater microorganismos, iniciar respostas de reparo tecidual e encontrar e fagocitar células apoptóticas (GHELER et al., 2021). Além disso, o SP atua convertendo o ATP extracelular em adenosina (Ado), por meio de um processo de degradação realizado pelas ectoenzimas ectonucleosídeo difosfohidrolase (NTPDase, sendo que a NTPDase 1 é conhecida também pela sigla CD39) e ecto-5'-nucleotidase (CD73) (ARAÚJO et al., 2021).

A CD39 converte ATP em difosfato de adenosina (ADP), e este em monofosfato de adenosina (AMP), enquanto que a CD73 converte AMP em Ado. A Ado extracelular é um metabólito com efeito imunossupressor, antiinflamatório e anti agregante plaquetário. No microambiente tumoral, a Ado suprime a imunidade antitumoral, essencialmente através dos receptores de Ado, A2A e A2B (BUISSERET et al., 2017). Nesse viés, estudos buscam modular essa sinalização como tentativa de tratamento para a doença.

Ademais, o sistema estudado é composto por diversos receptores subdivididos em duas famílias P1 e P2. Destaca-se para este estudo os receptores P2Y1, P2Y12 e P2X1, que são os mais expressos em plaquetas e mediam a agregação plaquetária (BURNSTOCK, 2017).

As plaquetas são particularmente avaliadas na presença de neoplasias: 30% dos pacientes apresentam aumentos na plaquetometria e 11% apresentam diminuição (SUN et al., 1979). Os êmbolos tumorais geralmente são envoltos em uma rede de fibrina e plaquetas, que possibilitam a adesão endotelial, que resulta na perda do controle da agregação plaquetária, anticoagulação e vasodilatação local (RENNI, 2017). O processo hemostático se dá a partir de reações bioquímicas e regulatórias que culminam no impedimento do sangramento dos vasos sanguíneos, os quais foram quimicamente ou fisicamente traumatizados. As plaquetas são fundamentais para a manutenção da integridade vascular e prevenção de hemorragias (SALLES et al., 2008).

A ativação plaquetária é, em geral, iniciada pela exposição a um agonista plaquetário que se liga aos receptores de superfície e engatilha uma cascata de eventos bioquímicos. A trombina, o colágeno, o ADP, a epinefrina e o tromboxano A2 (TXA2) são estímulos fisiológicos para a ativação plaquetária (MESA; ALFONSO, 2000). O ADP tem papel fundamental no processo de ativação, agindo sobre os receptores purinérgicos P2X1, P2Y1 e P2Y2, localizados na superfície das plaquetas, que age sinergicamente na mudança da conformação, prolongando a ativação e tornando-a irreversível (GACHET, 2008).

A sinalização purinérgica envolve três componentes essenciais: uma fonte de nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP), receptores específicos, através dos quais os nucleotídeos exercem seus efeitos, e as enzimas ectonucleotidases, responsáveis pelo controle dos níveis dessa emissão no meio extracelular (ROBSON, et al., 2006). O metabolismo extracelular destes nucleotídeos, que geram nucleosídeos, possuem função regulatória importante no controle da homeostase, principalmente por regularem a agregação plaquetária, através dos receptores purinérgicos P2 (ZIMMERMANN, 1999; ATKINSON et al., 2006).

Após a hidrólise do ATP e ADP em AMP pela E-NTPDase1, tem-se a ação da E-5'-NT (EC 3.1.3.5; CD73), que hidroliza o AMP em adenosina, que atua como modulador do tônus vascular e um inibidor da agregação plaquetária. Tanto a ENTPDase1 quanto E-5'-NT estão localizados na membrana plaquetária e possuem papel importante regulação do fluxo sanguíneo e trombogênese (MARCUS et al., 2005; KAWASHIMA et al., 2000).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo é verificar a hidrólise de ATP, ADP, AMP e ADA em plaquetas de indivíduos saudáveis em comparação com indivíduos com CM.

A questão norteadora desta pesquisa, considerando o exposto acima, é: "Existe diferença na hidrólise de marcadores do sistema purinérgico em plaquetas de mulheres com câncer de mama em relação a indivíduos saudáveis?" De forma a esclarecer as implicações do sistema purinérgico no CM.

Essa pesquisa é um recorte do projeto guarda-chuva intitulado "Banco de biópsias para avaliação da expressão gênica e protéica dos receptores e enzimas do sistema purinérgico com ênfase em tumores de mama, próstata e colorretal" aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEP-UFFS) sob CAAE nº 09306919.5.0000.5564 em 27 de junho de 2019. Texto.

1.1 TEMA

O delineamento temático deste estudo é evidenciar, a partir de métodos quantitativos, a relação do sistema purinérgico em plaquetas de mulheres com diagnóstico de Câncer de Mama (CM) em comparação com mulheres saudáveis.

1.2 PROBLEMA

O sistema purinérgico surge como uma nova perspectiva de desvendar a fisiopatologia de processos biológicos normais e de diversas doenças, incluindo o câncer. Entretanto, pouco se conhece sobre a atividade e expressão dos componentes biológicos deste sistema no câncer de mama.

1.3 HIPÓTESE

Pacientes que apresentam neoplasias, como o CM, podem apresentar maior atividade das ectoenzimas em plaquetas ocasionada pelo dano tecidual provocado pelo tumor e sua ação no organismo humano.

1.4 JUSTIFICATIVA

Considerando que: a) o CM é um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, com destaque à região sul, com altas taxas de incidência e mortalidade associadas; b) os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina possuem relação importante com desenvolvimento do câncer; c) a sinalização purinérgica possui relação com inflamação e o câncer, devido ao acúmulo do ATP extracelular no interstício do tumor; d) a fisiopatologia do CM relaciona-se com os componentes da sinalização purinérgica, principalmente pela atividade do ATP quando presente no meio extracelular; torna-se fundamental aprofundar o conhecimento a respeito do envolvimento das enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina no desenvolvimento e progressão do câncer, de forma a esclarecer os mecanismos de progressão tumoral e indicar potenciais abordagens terapêuticas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade das ectonucleotidases em plaquetas de mulheres com câncer de mama (CM) em comparação com mulheres saudáveis.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a amostra;
- Avaliar a hidrólise de ATP em plaquetas das pacientes em relação ao grupo controle;
- Avaliar a hidrólise de ADP em plaquetas das pacientes em relação ao grupo controle;
- Avaliar a hidrólise de AMP em plaquetas das pacientes em relação ao grupo controle;
- Avaliar a quantificação de ADA em plaquetas das pacientes em relação ao grupo controle;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CÂNCER DE MAMA

O Câncer de Mama (CM) é uma neoplasia caracterizada pelo crescimento irregular de células, causado por inúmeras alterações no material genético e na expressão gênica. Além disso, o tecido mamário é sensível ao desenvolvimento de câncer por várias razões, dentre estas, destaca-se o hormônio feminino estrogênio, o qual estimula a divisão das células mamárias (FORCADOS et al., 2017).

Nesse contexto, o CM é o mais comumente diagnosticado entre as mulheres, e a principal causa de morte. Em 2020, mais de duas milhões de pessoas foram diagnosticadas com CM em todo o mundo e mais de 680 mil perderam a vida (GLOBOCAN, 2020).

Essa neoplasia caracteriza-se como uma doença multifatorial, contudo, a idade acima dos 50 anos, além de fatores genéticos, menopausa tardia, obesidade, sedentarismo e exposições frequentes a radiações ionizantes, destacam-se como fatores mais relevantes no surgimento da doença (INCA, 2020).

O CM ocorre quando há crescimento celular desregulado dentro de qualquer um dos componentes da mama (lóbulos, ductos, tecido adiposo e tecido linfático). Entretanto, cerca de 80% dos casos começam no epitélio do ducto mamário. Esse crescimento desregulado começa com modificações no ciclo celular, devido a alterações na informação genética, resultando inicialmente em um nódulo mamário indolor (ARAÚJO et al., 2021).

Com o avanço dos estudos, há diversos métodos de tratamento para a doença, sendo estes locais ou sistêmicos. Atualmente, a abordagem terapêutica advém do estadiamento do tumor, nesse sentido, variam desde cirurgias de ressecção até terapias de atuação ampla no organismo como, por exemplo, a quimioterapia (BRASIL, 2022).

Ademais, existem terapias com o objetivo de prevenção, essas são restritas a indivíduos com propensão para o desenvolvimento da doença. O uso de antiestrogênios, como raloxifeno e tamoxifeno para essa finalidade são amplamente utilizados. Além disso, a cirurgia de ambas as mamas, chamada de mastectomia radical, é uma medida preventiva adicional para mulheres cuja probabilidade de desenvolver o CM é aumentada (AKRAM et al., 2017).

2.1.1 Classificação do Câncer de Mama

O câncer de mama se trata de uma neoplasia epitelial, heterogênea clínica e morfológicamente, de comportamento e prognóstico variado. Por possuir uma ampla variedade de subtipos, 20 na atualidade, são distintas as manifestações e por consequência, cada paciente apresenta diferente resposta terapêutica (FREITAS, 2019).

Dentre e as alterações morfológicas anormais do tecido mamário pode-se encontrar as hiperplasias e carcinomas, sendo que os carcinomas são, ainda, divididos entre *in situ* e invasivo. O carcinoma *in situ* se caracteriza lesões pré-invasivas em que as células neoplásicas estão confinadas às estruturas mamárias (ductos ou lóbulos), sem penetração da membrana basal, ao contrário dos carcinomas invasivos (AKRAM et al., 2017).

Em relação ao tipo histológico, o adenocarcinoma é o câncer mamário mais comum, o tipo histológico mais comum é o carcinoma ductal infiltrante, seguido pelo carcinoma lobular infiltrante, ambos possuem a mesma origem no segmento da unidade de ducto lobular terminal, sendo que os carcinomas ductais tem origem nos ductos, enquanto que os lobulares se originam dos lóbulos. Os carcinomas lobulares invasivos bem diferenciados ou moderadamente diferenciados geralmente apresentam Receptor de Estrogênio (RE-) positivos e são associados ao Carcinoma Lobular *in situ* (CLIS), raramente apresentando superexpressão HER2. (FREITAS, 2019).

Quanto ao grau histológico, que compara a semelhança entre as células cancerígenas com as células normais, tem sua classificação realizada com base em três parâmetros: o grau de diferenciação arquitetônica (formação de túbulos), pleomorfismo nuclear (grau nuclear) e proliferação (índice mitótico). Cada um desses parâmetros recebe uma pontuação de 1 a 3 e, ao final, todos são somados para classificar em Grau I, II ou III. O Grau I (pontuação de 3 a 5) é considerado um carcinoma bem diferenciado (baixo grau), ou seja, suas células apresentam maior semelhança em relação às células normais da mama. Já o Grau II (pontuação 6 ou 7) caracteriza a neoplasia mamária como moderadamente diferenciada ou de grau intermediário, enquanto um carcinoma Grau III (pontuação 8 e 9) é pouco diferenciado ou de alto grau, com células muito diferentes das normais (HORTOBAGYI et al., 2018).

Através da imuno-histoquímica pode-se identificar a presença de marcadores como os receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) e HER2. A partir disso, sugere se acontecerão respostas às terapias específicas, como a anti-estrogênica e a anti-HER2. Informações como essa são de valor imprescindível no tratamento do câncer de mama, pois

alguns tumores (15%) não apresentam nenhum desses três receptores (chamados de triplo negativos) e, dessa forma, não apresentam resposta ao tratamento com anti-estrogênico ou antiHER2 (BRITT et al., 2020).

O Ki-67 é uma proteína nuclear presente universalmente em momentos de replicação celular, e está ausente nas células em repouso. Devido a isso, se tornou um marcador importante de proliferação celular, e o seu percentual presente no tumor auxiliar na identificação de pacientes com prognóstico bom ou ruim. Baseado nos receptores hormonais (RE e RP), no HER-2 e no Ki-67 pode-se dividir o câncer de mama em quatro grupos moleculares: o Luminal A, Luminal B, o triplo-negativo (basal-like ou basal-símile) e o HER-2-like (BUIRAGO et al., 2011).

2.2 O SISTEMA PURINÉRGICO

O sistema purinérgico é um sistema enzimático envolvido na regulação da homeostase imunológica. Sua ação ocorre através da secreção de citocinas, quimiocinas, remoção de patógenos intracelulares, liberação de antígenos e geração de eEROs. Quando ocorre algum tipo de lesão celular, os mediadores purinérgicos são liberados (ARAÚJO et al., 2021).

Esse sistema é composto por diversas enzimas que atuam na hidrólise do ATP. São elas enzimas moduladoras como a NTPDase (CD39) que hidrolisa ATP a ADP e ADP a AMP, a ecto-5'-nucleotidase capaz de gerar adenosina, as ENPPs que hidrolisam o ATP diretamente à AMP, e a adenosina desaminase (ADA) que hidrolisa adenosina em inosina e hipoxantina. A enzima Adenosina Deaminase (ADA) atua como conversora das moléculas derivadas da ADO que são as sinalizadoras do sistema. A ADA funciona como catalisadora das reações de desaminação da adenosina, ou seja, é capaz de acelerar a degradação dos derivados de adenosina (BOISON, 2012).

Ainda, é necessário entender que o sistema purinérgico possui uma gama de receptores que são capazes de modular a sinalização extracelular, através da ligação dos nucleotídeos ou nucleosídeo de ADO aos seus receptores específicos. Nesse sentido, dividem-se os receptores em duas famílias: família P1 de receptores que respondem à Ado, e família P2 de receptores que respondem à nucleotídeos. A família P1 é composta por quatro subtipos de receptores: A1, A2A, A2B e A3; a família P2 subdividida em receptores ionotrópicos (classe P2X) e metabotrópicos (classe P2Y) (ARAÚJO et al., 2021).

Em relação à família P1, sabe-se que os subtipos mais expressos nas células tumorais são A3 e A2B, e que no CM eles atuam no aumento da motilidade das células tumorais e induzem migração e metástase, respectivamente. Os receptores da família P2 têm o ATP como principal molécula estimuladora. Os receptores P2X são subdivididos em sete grupos, P2X1 até P2X7, eles são canais iônicos permeáveis para sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cálcio (Ca²⁺), sendo o ATP o único ligante que os ativa. Em tumores, o receptor P2X7 é o mais expresso e auxilia na disseminação de metástases e invasão de células cancerosas. Os receptores P2Y, em geral, tendem a promover a migração e contribuir para a formação de nichos metastáticos, esse grupo é composto por oito subtipos de receptores: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12, P2Y13, P2Y1 e P2Y11. Esses receptores têm preferência de ativação por Adenosina Difosfato (ADP), Uridina Difosfato (UDP) e Uridina Trifosfato (UTP), com exceção do P2Y11 em que o ATP é o ligante principal. Dessa forma, o sistema purinérgico atua convertendo o ATP extracelular Ado, por meio de um processo de degradação realizado pelas ectoenzimas NTPDase, principalmente a CD39 e ecto-5'-nucleotidase, principalmente aCD73. Enquanto a CD39 converte ATP e ADP em AMP, a CD73 converte transforma AMP em Ado; finalizando com a ADA, que transforma a Ado formada em inosina e hipoxantina (ARAÚJO et al., 2021).

O ATP atua como um sinal de alerta no ambiente extracelular, ativando as células imunes para combater microorganismos, iniciar respostas e eliminar invasores. Os nucleotídeos (ATP, ADP, UTP e UDP) e nucleosídeo (Ado) são caracterizados como mensageiros extracelulares, salienta-se que eles estão presentes no organismo em situações de homeostase, contudo em situações estressoras a liberação é aumentada (GHELER et al., 2021).

A enzima CD73 e os receptores de Ado a jusante estão emergindo como alvos terapêuticos atraentes para promover respostas imunes antitumorais. O CD73 é expresso na superfície de células tumorais, células estromais e células imunes. A Ado extracelular é um metabólito imunossupressor que protege os tecidos contra a inflamação excessiva. No microambiente tumoral, a Ado suprime a imunidade antitumoral, essencialmente através dos receptores A2A e A2B (BUISSERET et al., 2017).

2.2.1 O Sistema Purinérgico no câncer de mama

O ATP e seus produtos têm atuação bifásica conhecida no CM. Pesquisas recentes identificaram um dos papéis dos receptores P2X7 e A2A no CM, frente ao ATP extracelular vindo de osteócitos (JIANG, 2015). Segundo o estudo de Zhou, o ATP liberado por células não-

tumorais de osteócitos se liga a receptores P2X7 das células tumorais, inibindo o crescimento do CM, migração e metástase óssea (ZHOU, 2015). Assim, essa molécula pode também configurar como alvo terapêutico.

Devido à instabilidade, o ATP é hidrolisado em ADP e AMP pela CD39, e em Ado pela CD73, expressas em células tumorais da mama. A Ado se liga ao receptor A2A, o que repercute no crescimento do câncer e sua metastização. Em baixas concentrações, o ATP tem efeito inibitório sobre a migração de células de CM, porém quando em maior quantidade possui um efeito estimulatório (ZHOU, 2015).

Altas concentrações de ATP em tecido mamário têm responsabilidade pela morte celular P2X7-dependente, enquanto que pequenas concentrações de P2X7 foram responsáveis por mudanças morfológicas que levam à aquisição de um fenótipo pró-migratório (JELASSI, 2011). Avanzato et al. (2016) apresentaram o receptor P2Y11 como contribuinte na regulação da migração de células de CM. Nesse sentido, as proteínas-G acopladas a estes receptores liberam o íon Ca^{2+} dos compartimentos intracelulares, assim como os receptores P2X7 aumentam a entrada de íons de Ca^{2+} extracelulares, o que, segundo o estudo, é um mecanismo que favorece a migração de células cancerosas.

2.2.2 O sistema purinérgico em plaquetas no câncer de mama

As plaquetas são particularmente avaliadas na presença de neoplasias: 30% dos pacientes apresentam aumentos na plaquetometria e 11% apresentam diminuição (SUN et al., 1979). Os êmbolos tumorais geralmente são envoltos em uma rede de fibrina e plaquetas, que possibilitam a adesão endotelial. A adesão desse trombo tumoral ao endotélio, leva à lesão e, conseqüentemente, à liberação do fator de permeabilidade vascular, além da perda do controle da agregação plaquetária, anticoagulação e vasodilatação local (RENNI, 2017).

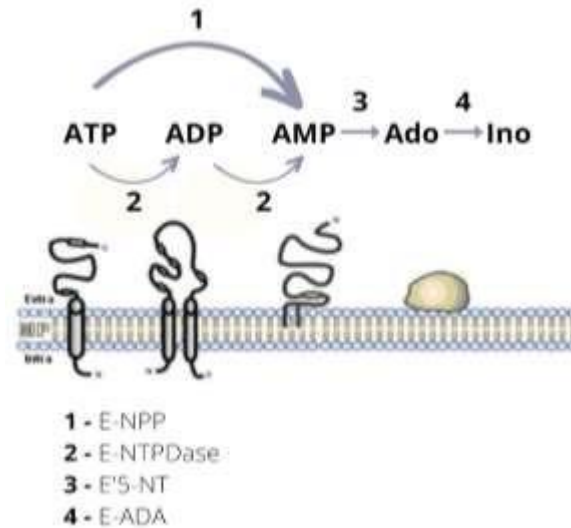
O processo hemostático se dá a partir de reações bioquímicas e regulatórias que culminam no impedimento do sangramento dos vasos sanguíneos, os quais foram quimicamente ou fisicamente traumatizados. Para que isso ocorra, existe a interação de três sistemas biológicos: (1) componentes da vasculatura, incluindo células endoteliais; (2) plaquetas sanguíneas; (3) proteínas plasmáticas das vias de coagulação intrínseca e extrínseca (MARCUS, 1999). As plaquetas são fundamentais para a manutenção da integridade vascular e prevenção de hemorragias (SALLES et al., 2008).

A ativação plaquetária é, em geral, iniciada pela exposição a um agonista plaquetário que se liga aos receptores de superfície e engatilha uma cascata de eventos bioquímicos. A trombina, o colágeno, o ADP, a epinefrina e o tromboxano A₂ (TXA₂) são estímulos fisiológicos para a ativação plaquetária (MESA; ALFONSO, 2000). O ADP tem papel fundamental no processo de ativação, agindo sobre os receptores purinérgicos P₂X₁, P₂Y₁ e P₂Y₂, localizados na superfície das plaquetas, que age sinergicamente na mudança da conformação, prolongando a ativação e tornando-a irreversível (GACHET, 2008). O ADP e o ATP contidos nos grânulos densos das plaquetas estão envolvidos primariamente no processo hemostático (CLEN et al., 2000). A ativação plaquetária é um fator crítico para que facilite a agregação das plaquetas, pois ADP, TXA₂ e fibras colágenas são mediadores potentes nesse processo (ARMSTRONG; GOLAN, 2007). A liberação do ADP, ATP (em concentrações baixas) e do TXA₂, causa agregação adicional de plaquetas no local da lesão vascular. O ADP provoca ingurgitamento das plaquetas e estimula a adesão entre as membranas das plaquetas adjacentes, ocorrendo ainda mais liberação de ADP e TXA₂. Essa retroalimentação positiva proporciona a formação de massa de plaquetas de tamanho suficiente para ocluir a região da lesão vascular (LEON et al., 2004).

A sinalização purinérgica envolve três componentes essenciais: uma fonte de nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP), receptores específicos, através dos quais os nucleotídeos exercem seus efeitos, e as enzimas ectonucleotidases, responsáveis pelo controle dos níveis dessa emissão no meio extracelular (ROBSON, et al., 2006). O metabolismo extracelular destes nucleotídeos, que geram nucleosídeos, possuem função regulatória importante no controle da homeostase, principalmente por regularem a agregação plaquetária, através dos receptores purinérgicos P₂ (ZIMMERMANN, 1999; ATKINSON et al., 2006).

O ADP atua como principal promotor da agregação plaquetária, já a adenosina é um potente inibidor. O ATP quando secretado para o meio extracelular de plaquetas é capaz de mediar a reatividade plaquetária (BIRK et al., 2002). A concentração desses nucleotídeos extracelulares, bem como as respostas celulares, são reguladas após executarem seus efeitos, para que os níveis fisiológicos sejam mantidos. Esse processo de regulação é realizado por um complexo multienzimático chamado de “ectonucleotidases”. Essas enzimas incluem: as ectonucleosídeo-trifosfo-difosfohidrolases (E-NTPDases, CD39), as ectonucleotídeopirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), as ecto-fosfatases alcalinas e a ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT, CD73) (ROBSON et al., 2006). (ZIMMERMANN, 2001).

Figura 1: Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina.



Fonte: autoras, 2023.

A E-NTPDase (nucleosídeo trifostato 5'-difosfo hidrolase ou apirase; CD39) hidrolisa o ATP e ADP, liberado pelas plaquetas habilitadas. No processo de hidrólise do ATP, ADP e AMP, a adenosina é liberada. A adenosina inibe a agregação plaquetária, expressão do fator tecidual ou lista de adesão (KAWASHINA et al., 2000; ARMSTRONG et al., 2006).

Após a hidrólise do ATP e ADP em AMP pela E-NTPDase1, tem-se a ação da E-5'-NT (EC 3.1.3.5; CD73), que hidroliza o AMP em adenosina, que atua como modulador do tônus vascular e um inibidor da agregação plaquetária. Tanto a E-NTPDase1 quanto E-5'-NT estão localizados na membrana plaquetária e possuem papel importante na regulação do fluxo sanguíneo e trombogênese (MARCUS et al., 2005; KAWASHIMA et al., 2000).

A adenosina desaminase (E-ADA, ADA; EC 3.5.4.4) é uma importante enzima desaminante, pertencente ao metabolismo purinérgico, que converte de forma irreversível adenosina em inosina, sendo responsável pela regulação da concentração da adenosina extracelular (CRISTALLI et al., 2001). Em humanos existe na forma de duas isoenzimas classificadas como: ADA1 e ADA2, cada uma com suas propriedades bioquímicas particulares (SHAROYAN et al., 2006)

A ADA1 está localizada principalmente no citosol, sendo encontrada em todas as células e tecidos humanos e quase toda a atividade da ADA humana é atribuída a esta isoenzima (ZAVIALOV e ENGSTROM, 2005). A ADA2 é encontrada predominantemente em soro de

indivíduos normais e representa a menor parte da atividade da ADA total em tecidos, sendo que a maioria das células humanas contém pequena quantidade de ADA2 (UNGERER et al., 1992; GAKIS, 1996).

O câncer e seus diversos tratamentos são reconhecidos como fatores de risco independentes para o desenvolvimento de tromboembolismo venoso (TEV). A associação clínica entre neoplasias e distúrbios de coagulação é conhecida, e os eventos tromboembólicos são mais frequentes em pacientes oncológicos. As proteínas de coagulação do sangue desempenham papéis importantes na biologia tumoral: o papel pró-coagulante intravascular e extravascular; e o aprimoramento das células tumorais na angiogênese, crescimento e metástase (RENNI, 2017). O CM ainda é uma patologia com alta incidência e mortalidade. Entendendo o impacto da tromborregulação no câncer, bem como a relação direta do sistema purinérgico nesses mecanismos de regulação, faz-se necessário investigar a relação entre sistema purinérgico, plaquetas e câncer de mama, além dos possíveis impactos destes na progressão e/ou tratamento da doença.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, de análise quantitativa, do tipo caso-controle. Foram avaliados a hidrólise de ATP, ADP, AMP e quantificação da ADA em plaquetas de pacientes com câncer de mama e de indivíduos controle.

3.2 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Chapecó, Santa Catarina (SC), e teve como ponto de coleta de dados e amostras biológicas o serviço público de referência para tratamento oncológico da região, a Associação Hospitalar Lenoir Vargas Ferreira - Hospital Regional do Oeste (HRO). As mulheres saudáveis (controles) foram selecionados no próprio HRO (acompanhantes dos pacientes), com base no pareamento por idade e sexo em relação às pacientes, a coleta de sangue ocorreu nas dependências do hospital.

3.3 AMOSTRA

A amostra foi composta por um grupo de 17 mulheres com CM, que não iniciaram o tratamento cirúrgico e/ou farmacológico, e outro por 19 mulheres saudáveis, sem histórico de câncer em qualquer sítio, que foram selecionadas por amostragem não probabilística, do tipo por conveniência (OLIVEIRA, 2001).

3.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas no estudo pacientes do sexo feminino procedentes do oeste de SC, diagnosticadas por médico especialista, com carcinoma mamário, maiores de 18 anos de idade, que seriam submetidas a procedimentos cirúrgicos para retirada do tumor, e que não tinham

sido submetidas a nenhum tipo de terapia neoadjuvante (quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia, terapia de precisão).

Os indivíduos controles foram incluídos com base no pareamento por idade (mais ou menos 3 anos) e sexo em relação as pacientes, estes não poderiam apresentar diagnóstico passado ou atual de câncer de qualquer tipo, ou de doenças inflamatórias crônicas. As informações sobre doenças inflamatórias crônicas das pacientes e controles foram obtidas por análise dos prontuários médicos e a partir de conversa com os participantes, respectivamente.

3.4 COLETA DE DADOS

3.4.1 Coleta do material biológico

No momento da venóclise, realizada pelo médico anestesiológico, foram coletadas amostras de tecido sanguíneo. A amostra sanguínea conteve no mínimo 30 ml de sangue total em tubos vacutainer.

3.4.2 Processamento do material biológico

O transporte das amostras sanguíneas do HRO para o laboratório de pesquisa da UFFS campus Chapecó foi realizado pelos pesquisadores responsáveis, em recipiente adequado (caixas de isopor). As amostras ficaram armazenadas em geladeira até o momento do processamento, com os respectivos registros de monitoramento e controle, observando preferencialmente o tempo máximo de 8 (oito) horas, não excedendo 24 (vinte e quatro) horas, contadas a partir do fim da coleta.

3.4.3 Separação das plaquetas

Para a separação de plaquetas foi utilizado tubo com citrato (tampa azul). A amostra do sangue total com citrato foi centrifugada 10 minutos a 1200 rpm, retirado o sobrenadante e colocado em um tubo de ensaio. O tubo de ensaio com o sobrenadante foi centrifugado por 30 minutos à 5000 rpm, após esse processo as plaquetas ficaram no fundo do tubo de ensaio, foi

retirado o sobrenadante e realizado lavagem das plaquetas com 2 ml do tampão HEPES, homogeneizando com a pipeta até a completa dissolução. Esse homogeneizado foi para a centrífuga por mais 10 minutos a 5000 rpm. Após esse processo foi adicionado 300µl do tampão HEPES e guardado.

3.4.4 Análises do material biológico

3.4.4.1 Dosagem das proteínas em plaquetas por BRADFORD:

Em um tubo de ensaio foi retirado 10uL das amostras, já homogeneizadas, e pipetado as amostras em tubos com 2,5mL de comassie. Após, foi inserido o conteúdo do tubo de ensaio em uma cubeta de leitura. Para o branco da amostra foi utilizado somente os 2,5mL de comassie. Feita a leitura das amostras, foi anotado a absorbância de cada leitura (amostra) e utilizado o seguinte cálculo para cada amostra: $Abs\ da\ amostra \times FCC/0.01\ (10\ \mu L)$. Para plaquetas, as proteínas foram ajustadas em uma faixa de 0,4 a 0,6 mg/mL.

3.4.4.2 Determinação da atividade de E-NTPDase e E-5'-NT:

O ensaio enzimático da E-NTPDase em plaquetas foi realizado em meio reacional contendo 5 mM de CaCl₂, NaCl 1200 mM, KCl 5 mM, glicose 600 mM e tampão Tris-HCl 500 mM pH 8.0, em um volume final de 160 µL conforme descrito por Leal et al., 2005. Para a hidrólise de AMP, a atividade E-5'-NT foi realizada conforme descrito anteriormente, exceto que o MgCl₂ 100 mM foi adicionado e o tampão Tris-HCl 500 mM teve pH ajustado para 7.4. Vinte microlitros das plaquetas isoladas foram adicionados à mistura reacional e pré-incubados por 10 min a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 20µL de ATP ou ADP e incubada por 80 min. Ambos os ensaios enzimáticos foram interrompidos pela adição de 200µL de TCA a 10%. Posteriormente, foi utilizado uma placa nova, pipetado 30µL do conteúdo de cada poço na nova placa, completado com 300µL de verde de malaquita por poço, aguardados 10 min e executado a leitura. Os controles foram realizados para corrigir hidrólises não enzimáticas de nucleotídeos adicionando a preparação de enzima após a adição de 10% de TCA. Todas as

amostras foram executadas triplicadas. As atividades específicas da enzima são relatadas como nmol Pi liberado/min/mg de proteína.

3.4.4.3 Determinação da atividade de E-ADA

A atividade de E-ADA de plaquetas foi determinada de acordo com Giusti e Galanti (1974), com base na medição direta da formação de amônia produzida quando a adenosina desaminase atua em excesso de adenosina. Resumidamente, 30µL de plaquetas reagiram com 90µL de adenosina e foram incubados a 37°C por 60 min. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de uma solução de fenol e nitropussiato de sódio 80µL e uma solução de hipoclorito 80µL. A quantidade de amônia produzida foi medida a 620 nm e os resultados foram expressos em U/L.

3.4.5 Análise dos prontuários

As informações obtidas a partir dos prontuários médicos foram aquelas em relação à idade, subtipo histológico do tumor, estágio tumoral, tamanho do tumor, grau histológico, receptores imunoistoquímicos tumorais, metástases, história familiar de câncer, comorbidades (hipertensão, síndrome metabólica, diabetes, entre outras).

3.4.6 Análise estatística

Os dados foram tabulados e analisados primariamente utilizando o aplicativo *Microsoft EXCEL 2010*, e após, as análises estatísticas foram realizadas com o software *GraphPad Prism 9 (Prism 7.03, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA)*.

Os dados obtidos foram primeiramente testados quanto a sua normalidade, e em seguida analisados pelos métodos estatísticos do Teste T de *student*. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Para o estudo foram eliminados os *outliers*.

3.4.7 Aspectos éticos

Este projeto faz parte de um projeto guarda-chuva intitulado “Banco de biópsias para avaliação da expressão gênica e protéica dos receptores e enzimas do sistema purinérgico com ênfase em tumores de mama, próstata e colorretal”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS (CEP-UFFS), sob parecer nº 3.421.380 e CAAE nº 09306919.5.0000.5564, em 27 de junho de 2019. Os indivíduos participantes terão que assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de iniciar sua participação na pesquisa (ANEXO II).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No estudo participaram 36 mulheres, sendo 17 pacientes e 19 controles. A média de idade das participantes com câncer de mama foi de $58,62 \pm 13,58$ anos, e dos controles sem câncer foi de $58,72 \pm 11,15$ anos. A caracterização histológica e imunohistoquímica dos tumores nas pacientes com câncer de mama, bem como a distribuição quanto a presença de metástase, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização geral, histológica, imunohistoquímica e metástases da amostra.

Características Clínicas	Pacientes (n=17)
Características gerais:	
Idade média \pm desvio padrão da idade	58,62 \pm 13,58 anos
Tipo histológico do tumor [n (%)]:	
Carcinoma ductal invasivo	3 (17,64)
Carcinoma invasivo não especificado	12 (70,58)
Carcinoma mucinoso	1 (5,88)
Carcinoma lobular invasivo	1 (5,88)
Grau histológico [n (%)]:	
Grau 1	1 (5,88)
Grau 2	12 (70,58)
Grau 3	3 (17,64)
Sem informação no prontuário	1 (5,88)
Metástase nos linfonodos [n (%)]:	
Não	10 (58,82)
Sim	4 (23,52)
Sem informação no prontuário	3 (17,64)
Metástase à distância [n (%)]:	
Não	12 (70,58)
Sim	2 (11,76)
Sem informação no prontuário	3 (17,64)
Imuno-histoquímica Receptor Hormonal [n (%)]:	
Negativo	1 (5,88)
Positivo	12 (70,58)
Sem informação no prontuário	4 (23,52)
HER-2 [n (%)]:	
Negativo	11 (64,70)
Positivo	3 (17,64)
Sem informação no prontuário	3 (17,64)
Tipo de tumor [n (%)]:	
Luminal A	6 (35,29)
Luminal B	9 (52,94)
Sem informação no prontuário	2 (11,76)

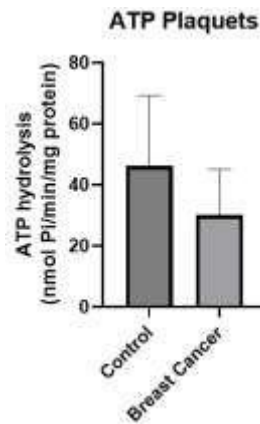
Fonte: autora, 2023.

Em relação aos subtipos histológicos dos tumores, três pacientes apresentavam Carcinoma Ductal Invasor (17,64%), uma possuía Carcinoma Mucinoso (5,88%), uma Carcinoma Lobular Invasor (5,88%) e doze (70,58%) não tiveram o subtipo histológico descrito em prontuário. Doze pacientes (70,58%), tinham tumores classificados como de grau 2; um (5,88%) como de grau 1; três (17,64%) como grau 3; e uma (5,88%) não tinha especificado em prontuário o grau tumoral. No que diz respeito à estratificação molecular, seis das participantes do estudo possuíam tumores do subtipo Luminal A (35,29%); nove Luminal B (52,94%). Apresentaram HER2 negativo 11 pacientes (64,70%) e três HER2 positivo (17,64%). A positividade para o ER e/ou PR foi descrita no prontuário de treze pacientes (76,47%), enquanto quatro (23,52%) não possuíam descrição de tais receptores hormonais.

Observa-se que apenas duas pacientes (11,76%) apresentavam metástase à distância. Três pacientes (17,64%) não foram encontradas informações referentes à presença ou ausência de metástase à distância. No que tange a presença de metástase linfonodal, quatro pacientes (23,52%) possuíam metástases para linfonodos descritas, enquanto em doze (70,58%) tal quadro não foi registrado. Informações quanto à presença ou não de metástase linfonodal não foram possíveis para três participantes (17,64%), uma vez que não foram encontrados registros em prontuário.

4.2 PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICO

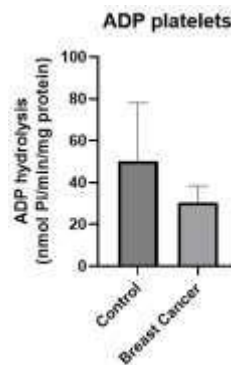
Em plaquetas houve diferença estatisticamente significativa na hidrólise de ATP entre pacientes e controles ($p < 0,05$), conforme evidenciado na figura 2. A atividade de CD39 foi medida pela hidrólise de ATP e ADP. Análise estatística: Teste t de *Student* e a normalidade foi testada pelo método de *Kolmogorov-Smirnov*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística demonstrou uma diminuição na atividade da ENTPdase por hidrólise de ATP no câncer de mama não tratado ($29,43 \pm 15,05$ nmol Pi/min/mg de proteína, $n=15$), quando comparados ao grupo controle ($46,16 \pm 23,16$ nmol Pi/min/mg de proteína, $n=19$), demonstrando significância estatística $p=0,0261^*$.



Fonte: autora, 2023.

Figura 2. Hidrólise de ATP em plaquetas de indivíduos controle e com câncer de mama não tratado.

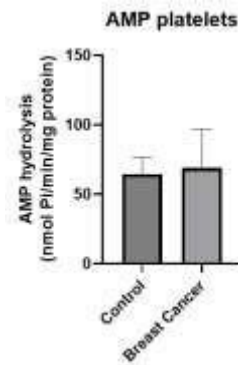
A figura 3 ilustra a hidrólise de ADP em pacientes com câncer de mama. Houve diferença estatisticamente significativa quanto à hidrólise de ADP em plaquetas de pacientes na comparação com o grupo controle. A hidrólise de ADP apresentou-se diminuída em plaquetas de pacientes ($33,84 \pm 23,68$ nmol Pi/min/mg de proteína, $n=15$) quando comparado com os indivíduos controle ($50,30 \pm 27,80$ nmol Pi/min/mg de proteína, $n=19$). Valor de $p=0,0180$.



Fonte: autora, 2023.

Figura 3. Hidrólise de ADP em plaquetas de indivíduos controle e com câncer de mama não tratados.

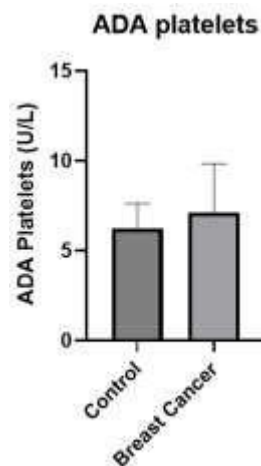
A figura 4 mostra que a hidrólise de AMP apresentou-se aumentada em indivíduos com câncer de mama não tratado quando comparado ao grupo controle ($63,35 \pm 27,92$ nmol Pi/min/mg de proteína, $n=15$) e controles ($64,55 \pm 12$ nmol Pi/min/mg de proteína, $n=19$) no entanto, não apresentou diferença significativa nas plaquetas de pacientes, $p=0,5560$.



Fonte: autora, 2023.

Figura 4. Hidrólise de AMP em plaquetas de indivíduos controle e com câncer de mama não tratados.

A atividade da ADA apresentou diferença, embora não estatisticamente significativa, nas plaquetas de pacientes ($6,81 \pm 13,71$ U/L, n=16) quando comparado com os indivíduos controle ($6,23 \pm 1,41$ U/L, n= 19). Valor de $p=0,2289$.



Fonte: autora, 2023.

Figura 5. Atividade da Ada em plaquetas de indivíduos controle e com câncer de mama não tratados.

5 DISCUSSÕES

A amostra desse estudo foi composta por mulheres com média de idade de $58,62 \pm 13,58$ anos, que coincide com o perfil de mulheres com câncer de mama no Brasil, com incidência predominante na faixa etária de 50 a 69 anos. Observou-se também carcinomas invasores localizados somente na mama em detrimento de uma menor taxa dos casos com metástases linfonodais e à distância, que corrobora com achados da literatura. Estudos científicos mostram que o carcinoma ductal invasor, seguido do lobular invasor são os tipos histológicos mais frequentes, contrário aos achados do presente estudo, em que prevaleceu o carcinoma invasivo não especificado, que pode ter relação com fragilidade dos registros em prontuário (AZEVEDO et al., 2017; MARTINS et al., 2009). O perfil imuno-histoquímico do presente estudo foi definido para mulheres que possuíam dados moleculares disponíveis. O luminal B (RE+ e/ou RP+), foi o mais frequente, seguido do luminal A (RE+ e/ou RP+), dados estes que estão compatíveis com os de Peruzzi et al. (2016), que analisou a distribuição dos subtipos moleculares de câncer de mama e correlacionou esses subtipos com o perfil etário e histológico.

Os presentes resultados demonstram que a hidrólise de nucleotídeos pelas plaquetas é alterada em pacientes com câncer de mama. A hidrólise de ATP foi diminuída em pacientes com CA de mama, refletindo na diminuição da hidrólise de ADP. Em contrapartida, a hidrólise de AMP, e a atividade de ADA demonstraram-se aumentados, embora não tenha sido observado alteração significativa. Tomados em conjunto, esses resultados demonstram uma diminuição da expressão de CD39 e aumento de CD73.

A literatura científica indica que nucleotídeos de adenina e adenosina possuem papel importante no crescimento tumoral. Tão importante quanto, evidências mostram que a adenosina pode funcionar como um estimulante do crescimento tumoral, enquanto o AMP exerce o efeito oposto (ARAUJO, 2005).

Um estudo de Spsychala e Kitajewski (2004) sugeriu que o aumento na geração de adenosina por tumores poderia ter relação com o desenvolvimento de resistência aos medicamentos, bem como um curso mais agressivo da doença. Entende-se que a alteração oncogênica específica causa aumento da expressão de 5'-nucleotidase, aumentando assim a capacidade das células de gerar adenosina durante a tumorigênese.

O câncer está associado a disfunções na agregação plaquetária, é plausível sugerir que mudanças nas atividades que metabolizam os nucleotídeos de adenina na superfície das plaquetas podem estar envolvidas nesse processo. A agregação plaquetária na presença de

baixas concentrações de ADP é um processo reversível. Os mecanismos enzimáticos que hidrolisam o ADP na circulação são muito importantes para limitar a agregação plaquetária, e as ectonucleotidases são fundamentais neste processo. Neste estudo, encontramos uma diminuição na atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP e ADP em pacientes com câncer de mama, sendo observada alteração significativa. Isso indica que a redução da atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ATP pode levar à diminuição da concentração extracelular de pico de ADP, que pode estar em um menor potencial de agregação plaquetária em pacientes com câncer de mama, que vai ao encontro de dados já demonstrados na literatura (ANDRADE, 2016).

Os resultados também mostraram um aumento na atividade da ADA em pacientes com câncer de mama, no entanto, não foi significativo. Esse aumento pode ser atribuído a uma resposta fisiológica ao aumento da concentração extracelular de adenosina nesses pacientes. No entanto, a alteração não significativa de E-5'-NT observada entre os grupos possivelmente pode ser atribuída ao aumento de adenosina por outras vias que não NTPDase-ATP/ADP, mostrando que pode haver excesso de AMP em pacientes com plaquetas, conforme aponta um estudo de Andrade, 2016.

A diminuição da atividade da E-NTPDase pode estar atrelada à redução da reatividade plaquetária nesses pacientes. Além disso, o aumento de E-ADA reflete no aumento de adenosina nesses pacientes, o que pode justificar a capacidade de ativação e agregação plaquetária diminuída.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP estão diminuídas em pacientes com câncer de mama quando comparados a indivíduos saudáveis, sendo estatisticamente significativo. Em contrapartida, A hidrólise de AMP e a atividade de ADA apresentam-se aumentadas, embora não exista relação estatisticamente significativa. Esses achados evidenciam o envolvimento do sistema purinérgico no câncer de mama.

Em conclusão, os resultados revelaram que as atividades de ENTPDase e E-ADA estão alteradas nas plaquetas de pacientes com CM, sugerindo que a sinalização purinérgica pode estar envolvida na tromborregulação do CM. A diminuição da atividade da E-NTPDase pode ser indício de redução da reatividade plaquetária nesses pacientes. Além disso, a menor capacidade de ativação e agregação plaquetária pode estar relacionada ao aumento da concentração de adenosina.

Faz-se necessário a abordagem de outros estudos de investigação dessa relação entre câncer de mama, plaquetas e sistema purinérgico, de modo que facilite a compreensão da efetividade do papel das ectonucleotidasas em relação ao câncer de mama, uma vez que a alterações de reatividade plaquetária geram implicações para o tratamento do CM, bem como na progressão da doença.

7 REFERÊNCIAS

AKRAM, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biol Res.** 2017 Oct 2;50(1):33. doi: 10.1186/s40659-017-0140-9. PMID: 28969709; PMCID: PMC5625777. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28969709/>. Acesso em: 24 dez. 2022.

ANDRADE, Sabrina Fontana de. Atividade de enzimas do sistema purinérgico em plaquetas de pacientes com mieloma múltiplo. **Dissertação**. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/18107>. Acesso em: 05 jan. 2023.

ANTONIOLI, L. et al. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Pharmacol Rev.** 2019 Jul; V. 71, n.3, p.345-382. doi: 10.1124/pr.117.014878. PMID: 31235653; PMCID: PMC6592405. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31235653/>. Acesso em: 05 dez. 2022.

ARAÚJO, Julia Beatrice de, et al. Visando a via purinérgica no câncer de mama e suas aplicações terapêuticas. **Machine Translated by Google**, agos./dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09760-9>. Acesso em: 05 fev.2023.

ARAÚJO, Maria do Carmo, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica.** Jan/2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443904002133?via%3Dihub>. Acesso em: 15 fev. 2023.

ARMSTRONG, W; GOLAN, D. **Pharmacology of Hemostasis and Thrombosis April.** Medicine, Biology. 2007. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Pharmacology-of-Hemostasis-and-Thrombosis-April-Armstrong-Golan/7be303448ee5f8d7ce29a362efd783e107a30502>. Acesso em: 10 fev. 2023.

ATKINSON, B., et al., Ecto-nucleotidases da família CD39/NTPDase modulam a ativação plaquetária e a formação de trombos: Potencial como alvos terapêuticos. **Sangue Células, Moléculas e Doenças. Blood Cells Mol Dis.** Fev/2006. V. 36, p. 217-222. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16476557/>. Acesso em: 02 fev. 2023.

AVANZATO, D. et al. Activation of P2X7 and P2Y11 purinergic receptors inhibits migration and normalizes tumor derived endothelial cells via cAMP signaling. **Scientific Reports.** v. 2;6:32602, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep32602>. Acesso em: 10 fev. 2023.

AZEVEDO, Daniela Batista et al. Perfil das mulheres com câncer de mama. **Rev Enferm UFPE.** 2017. V.11, n.6, p. 2264-72. DOI: 10.5205/reuol.10827-96111-1-ED.1106201702. Acesso em: 16 fev 2023.

BIRK, A.V et al., Papel de uma nova fosfohidrolase de nucleotídeo soluble de plasma de ovelha na inibição da reatividade plaquetária: Hemostasia, trombose e biologia vascular. **Jornal de Laboratório e Medicina Clínica**, v. 139, pág. 116-124, 2002.

BOISON, D. Adenosine Augmentation Therapy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. **Bethesda (MD)**: National Center for Biotechnology Information (US); 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK50785/>. Acesso em: 06 jul. 2022.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional de Câncer. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em 20 de dez de 2022.

BRITT, Kara L, et al. Key steps for effective breast cancer prevention. **Nature reviews-cancer**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0266-x>. Acesso em: 15 jan. 2022.

BUISSERET, L et al. Clinical significance of CD73 in triple-negative breast cancer: multiplex analysis of a phase III clinical trial. **Annals of Oncology**, v.29, n.4, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29145561/>. Acesso em: 15 jan. 2022.

BUITRAGO F; UEMURA G, SENA MCF. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Com Ciências Saúde**. 2011;22(Sup 1):S69–82.

BURNSTOCK, G. Receptores de purina e pirimidina. **Ciências da Vida Celular e Molecular**, v.64, pág. 1471-83, 2007.

CLEN, D. et al. Mecanismos moleculares de exocitose plaquetária: papel de SNAP-23 e sintaxina 2 na liberação de grânulos de núcleo denso. **Sangue**, v. 95, n. 3, pág. 921-929, fev. 2000.

CRISTALLI, G. et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. **Med Res Rev**. Mar/2001. V. 21, n2, p. 105-28. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11223861/>. Acesso em: 01 fev 2023.

FORCADOS, Gilead Ebiegeri et al. Oxidative Stress and Carcinogenesis: Potential of Phytochemicals in Breast Cancer Therapy. **Nutrition and Cancer, África do Sul**, v. 0, n. 0, jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28103111/> . Acesso em: 20 jan. 2022.

FREITAS, Flavia Fernandes. Correlação entre os fatores prognósticos clássicos e sobrevida em cinco anos de pacientes com carcinoma da mama em uma instituição pública do estado de Sergipe. **Monografia**. Universidade Federal de Sergipe. 2019. Disponível em: <https://ri.ufs.br/handle/riufs/15268>. Acesso em: 16 fev. 2023.

GACHET, Christian. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. **Thromb Haemost**. Mar/2008. V99, n 3, p. 466-72. DOI: 10.1160/TH07-11-0673. Acesso em: 10 fev. 2023.

GAKIS, C. Adenosina desaminase (ADA) isoenzimas ADA1 e ADA2: diagnóstico e papel biológico. **O Jornal Respiratório Europeu**, v. 9, pág. 623-624, 1996.

GHELER, Fernanda Valente et al. AMP hydrolysis reduction in blood plasma of breast cancer elderly patients after different treatments. **Bioquímica Molecular e Celular**, jan/mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04199-x>. Acesso em: 20 jan. 2023.

GLOBOCAN. **The Global Cancer Observatory**. Câncer hoje, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2023.

HORTOBAGYI, G. H.; CONNOLY, J. L.; D'ORSI, C. J. et al. Breast. In **AJCC Cancer Staging Manual**, 8th Edition. Chicago, Springer, p.589-628, 2018

INCA. **Instituto Nacional do Câncer**. Ministério da Saúde. Estimativa para 2020. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios#:~:text=Para%20o%20Brasil%2C%20estimam%2Dse,mil%20mulheres%20\(Tab%20ela%201\)](https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios#:~:text=Para%20o%20Brasil%2C%20estimam%2Dse,mil%20mulheres%20(Tab%20ela%201).). Acesso em: 28 jan. 2023.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer**. Ministério da Saúde. Mamografia no SUS. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/dados-e-numeros/mamografia-no-sus>. Acesso em: 23 jan. 2023.

JIANG, J. X.; RIQUELME, M. A.; ZHOU, J. Z. ATP, a double-edged sword in cancer. **Oncoscience**, v. 2, p. 673, 30 ago. 2015.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMMIYA, H. Contribuição da ecto-5'-nucleotidase para a inibição da agregação plaquetária por células endoteliais humanas. **Sangue**, v. 96, n. 6, pág. 2157-2162, conjunto. 2000.

LEON, Catherine et al. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. **Blood**. Jan/2004. V. 103, n.2, p. 594-600. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/103/2/594/17827/Platelet-ADP-receptors-contribute-to-the>. Acesso em: 01 fev. 2023.

MARCUS, AJ et al., Papel do CD39 (NTPDase-1) na tromborregulação, cerebroproteção e cardio proteção. **Seminários em trombose e hemostasia**, v. 31, pág. 234-246, 2005.

MARCUS, AJ Plaquetas: seu papel na hemostasia, trombozes e inflamações. In: Gallin, JI e Spiderman, R. editores. **Inflamação: Princípios Básicos e Correlatos Clínicos**. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 77-95, 1999.

MARTINS, Edesio et al. Evolução temporal dos estádios do câncer de mama ao diagnóstico em um registro de base populacional no Brasil Central. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2009; 31(5):219-23. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbgo/a/pbz3vqRdwHgssspXp6hRHth/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 fev 2023.

MESA, MG; ALFONSO, CC. Características estruturais e funcionais das placas. **Rev Cub Angiol e Cir Vas** 1: 132-141, 2000.

PERUZZI, Caroline Portela; ANDRADE, Vera Regina Medeiros. Análise dos marcadores imuno-histoquímicos associados com câncer de mama em mulheres na Região das Missões,

Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Bras Mastologia**. 2016; V. 26, n. 4, p.181-5. DOI: 10.5327/Z201600040008RBM. Acesso em: 16 fev, 2023.

RENNI, MJP; CERQUEIRA, MH. TRUGILHO, IA; ARAUJO, MLC Junior; MARQUES, MA; KOCH, HA. Mecanismos do tromboembolismo venoso no câncer: uma revisão da literatura. **J Vasc Bras**. 2017 Oct-Dec; V. 16, n. 4, p.308-313. Portuguese. doi: 10.1590/1677-5449.007817. PMID: 29930665; PMCID: PMC5944308. Acesso em: 16 fev, 2023.

ROBSON, SC; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. **A família E-NTPDase de ectonucleotidases: relações estrutura-função e significado fisiopatológico. Sinalização Purinérgica**, v. 2, p.409-430, 2006.

SALLES, II et al., Características hereditárias que afetam a função plaquetária.**Revisão de sangue**,v. 22, pág. 155-172, 2008.

SCULLY, O. J., et al. Breast cancer metastasis. **Cancer Genomics Proteomics**. 2012 Sep-Oct;9(5):311-20. PMID: 22990110. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22990110/>. Acesso em: 28 jan. 2022.

SHAROYAN, Svetlana et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adeno-sine deaminase. **Acta Biochimica Polonica**. 2006. V. 53, n. 3, p. 539-546. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/6859682_Influence_of_dipeptidyl_peptidase_IV_on_enzymatic_properties_of_adenosine_deaminase. Acesso em: 01 fev, 2023.

SPYCHALA, J.; KITAJEWSKI, J. WnT and b-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. **Experimental Cell Research**, v. 296, p. 99-108, 2004.

SUN, Yi-Sheng et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v.13. n.0, p. 1387-1397, nov./ 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29209143/>. Acesso em: 25 jan. 2023.

UNGERER, JPJet al., Adenosina desaminase sérica: isoenzima e aplicação diagnóstica. **Química Clínica**, v. 38, pág. 1322-1326, 1992.

WHO, 2020.

ZAVIALOV, AV; ENGSTROM, A. O ADA2 humano pertence a uma nova família de fatores de crescimento com atividade de adenosina desaminase.**O Jornal Bioquímico**, v. 391, p. 51-57, 2005.

ZHOU, J. Z. et al. Differential impact of adenosine nucleotides released by osteocytes on breast cancer growth and bone metastasis. **Oncogene**, v. 34, n. 14, p. 1831–1842, abr. 2015.

ZIMMERMANN, H. Nucleotídeos e CD39: Principais atores modulatórios na hemostasia e trombose.Natureza **América Inc**, v. 9, pág. 987-988, 1999.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: alguns desenvolvimentos recentes e uma nota sobre nomenclatura. **Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos**, v. 52, pág. 44–56, 2001.

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFFS

Prezado (a) participante, Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: Biorrepositório de biópsias tumorais para avaliação da expressão gênica e protéica dos receptores e enzimas do sistema purinérgico com ênfase em tumores de mama, próstata e colorretal, desenvolvida por discentes e docentes do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó – SC, sob coordenação da Professora Dra. Sarah F. V. O. Maciel.

1. Objetivo Central

Construção e manutenção do Biorrepositório de amostras tumorais, a fim de pesquisar marcadores moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer, e com possibilidades de atuar no tratamento do câncer de mama, câncer de próstata ou câncer colorretal.

2. Critério de Inclusão

Pacientes: ambos os sexos, diagnosticados por médico especialista com câncer de mama (do tipo carcinoma ductal invasor), câncer de próstata (do tipo adenocarcinoma) ou câncer colorretal (do tipo adenocarcinoma), maiores de 18 anos de idade, que até o momento não realizaram cirurgia para retirada do tumor e nenhum tipo de tratamento (quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia, terapia de precisão). Serão excluídos pacientes com diagnóstico anterior de câncer, ou com doenças inflamatórias crônicas (diabetes, hipertensão, doença de Chron, retocolite ulcerativa, hiperplasia prostática benigna, mastite).

Controles: com base no pareamento por idade (mais ou menos 3 anos) e sexo em relação aos pacientes, que não apresentem diagnóstico passado ou atual de câncer de qualquer tipo, ou de doenças inflamatórias crônicas. Sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se deseja ou não participar, além de poder desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de explicação. Você não receberá remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa.

3. Mecanismos para garantir o sigilo e privacidade

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. As amostras biológicas e os dados clinicopatológicos dos participantes serão identificados por numeração sequencial, não tendo vínculo com a identificação do paciente. A qualquer momento você poderá solicitar aos pesquisadores informações sobre sua participação

e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo. Caso ocorra desistência, os materiais biológicos e as informações clinicopatológicas dos participantes serão descartados.

4. Identificação do participante ao longo do trabalho

Seu nome não será mencionado durante qualquer etapa desta pesquisa, bem como em quaisquer publicações, cursos, relatórios e afins. Apenas o nome da Instituição será mencionado. Para manter o seu anonimato, será utilizada uma codificação numérica sequencial. Cada participante terá um número distinto em todos os materiais e dados relacionados a ele.

5. Tempo de duração da coleta/procedimento/experimento

A sua participação na pesquisa consiste em: 1. Pacientes - responder aos questionários de estilo e qualidade de vida; utilização do material tumoral e sanguíneo (30 ml) coletado durante a cirurgia de remoção do tumor, materiais que, normalmente, seriam descartados após análise patológica; disponibilização das informações dos prontuários médicos (idade, sexo, subtipo histológico do tumor, estadiamento, etc). A pesquisa não irá gerar nenhum prejuízo no diagnóstico e tratamento da doença em questão; 2. Controles - responder aos questionários de estilo e qualidade de vida; utilização do material sanguíneo (30 ml) coletado durante a entrevista com os pesquisadores. As coletas serão realizadas pelos pesquisadores responsáveis e/ou médicos especialistas, em ambiente adequado no próprio HRO. O tempo de duração das coletas será de no máximo 30 minutos.

6. Guarda dos dados e materiais coletados na pesquisa

Todos os materiais biológicos serão guardados em freezer, devidamente identificados com numeração sequencial, nome do projeto e pesquisador responsável. Os outros materiais provenientes da pesquisa ficarão guardados em armário trancado com chave, ao qual somente o pesquisador responsável terá acesso. As tabelas com informações dos participantes da pesquisa ficarão guardadas nos computadores dos pesquisadores envolvidos, com acesso somente com senha. Todos os materiais serão mantidos pelo período de duração da pesquisa (5 anos). Após o término da pesquisa, os materiais biológicos e dados clinicopatológicos serão descartados.

7. Benefícios diretos (individuais ou coletivos) aos participantes da pesquisa

Grupos de encontros com os participantes da pesquisa e outros pacientes do setor de Oncologia do HRO, de maneira voluntária por ambas as partes, em sala reservada no próprio HRO, onde serão dadas, por parte dos pesquisadores envolvidos, orientações e esclarecimentos sobre as patologias incluídas na pesquisa e compartilhamento de experiências, a fim de melhorar a qualidade de vida dos participantes. Posteriormente, esses grupos também

permitirão o compartilhamento dos resultados obtidos na pesquisa, de maneira adequada para o entendimento por parte dos participantes.

8. Previsão de riscos ou desconfortos

A participação na pesquisa poderá causar riscos. Um risco previsível é o desconforto no momento da coleta de sangue, em decorrência da picada da agulha. Para minimizá-lo, a coleta será realizada por profissionais capacitados, visando a segurança dos participantes. Os pesquisadores explicarão detalhadamente o conteúdo da pesquisa e advertirão os participantes de que sua participação não é necessária caso não se sintam confortáveis para tal. Caso os riscos previstos ocorram, você receberá tratamento e acompanhamento até que esses desconfortos desapareçam. Outros danos que podem ser decorrentes da pesquisa são os psicológicos, visto que as patologias em questão podem provocar alterações psicossociais. Para minimizá-los, será explanado para os participantes o objetivo e finalidade da sua contribuição na pesquisa. Entretanto, caso sejam percebidos quaisquer distúrbios psicológicos no participante decorrente da pesquisa, este será encaminhado para o serviço de apoio psicológico do Centro de Saúde da Família (CSF) de referência, com a Equipe de Saúde da Família (ESF).

9. Divulgação dos resultados da pesquisa

A devolutiva dos resultados obtidos na pesquisa será realizada por meio de publicações científicas e participação em eventos científicos da área, com palestras e com o uso de poster e banner ou informativos online. Os dados pessoais dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Caso concorde em participar, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Desde já agradecemos sua participação!

Chapecó – SC, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Pesquisador Responsável