



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

ANA PAULA GERALDI NORBAH

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E INFLAMAÇÃO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

**CHAPECÓ
2023**

ANA PAULA GERALDI NORBAH

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E INFLAMAÇÃO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, sob a orientação da Prof^a Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel.

**CHAPECÓ
2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Sc-484, Km 02- Fronteira Sul
Chapecó, SC - Brasil
CEP 89815-899

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Norbah, Ana Paula Geraldi
AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E INFLAMAÇÃO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA / Ana Paula Geraldi Norbah.
-- 2023.
53 f.

Orientadora: Doutora Sarah Franco Vieira de Oliveira
Maciel

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas, Chapecó, SC, 2023.

I. Maciel, Sarah Franco Vieira de Oliveira, 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).

ANA PAULA GERALDI NORBAH

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E INFLAMAÇÃO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas defendido em banca examinadora em 07 de julho de 2023.

Aprovado em: 07/07/2023

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel - UFFS
Presidente da banca/orientadora



Prof^a Dra. Aline Manica – UNOCHAPECÓ
Membro titular externo



Prof^a Dra. Débora Tavares de Resende e Silva - UFFS
Membro titular interno

Chapecó/SC, julho de 2023

Dedico este trabalho a todos que direta ou indiretamente me incentivaram, apoiaram e ajudaram, para que esse final de ciclo fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Mãe Três vezes admirável de Shoenstatt por toda força, resiliência e proteção nos dias difíceis e por muitas vezes inacabáveis. Agradeço também aos meus Pais Paulo e Claudete por todo apoio, incentivo e por serem a minha referência de caráter e perseverança. Sou grata a todos os meus amigos e colegas de trabalho, pelo incentivo, auxílio e também por estarem ao meu lado nessa jornada.

Estendo meu agradecimento especial ao meu esposo Daniel por todo o cuidado, paciência, amor, apoio e auxílio diário. A minha filha Maria Helena pelo amor, carinho e sorriso, os quais me faziam seguir à frente. Com toda certeza sem vocês esse título não seria possível.

A minha orientadora Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel pelos ensinamentos, auxílio e dedicação para que este projeto fosse possível. Gratidão à todos os colegas do mestrado, professores, banca examinadora, técnicos do laboratório e em especial as minhas colegas de pesquisa Eduarda e Keroli pela parceria e auxílio em diversas etapas do projeto.

Por fim, agradeço a Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e o Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas (PPGCB) pelo título, aprendizado e oportunidade concedida. Meu muito obrigada a todos!

“A persistência é o menor caminho
do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

O câncer de mama é uma doença multifatorial ocasionada a partir de uma desregulação no ciclo celular, sendo considerado um problema de saúde pública mundial pela alta incidência e taxa de mortalidade elevada. Os mecanismos celulares envolvidos no processo de evasão celular desencadeiam diferentes processos inflamatórios e imunológicos, dentre estes, o sistema purinérgico, está envolvido no desenvolvimento tumoral, atuando também como um modulador imunológico e inflamatório. Considerando essas modulações celulares, novas estratégias diagnósticas e terapêuticas vêm sendo estudadas. **Objetivo:** Avaliar a atividade enzimática de componentes do sistema purinérgico e o perfil inflamatório em amostras sanguíneas de indivíduos com câncer de mama e de indivíduos controle. **Método:** Trata-se de estudo transversal, de análise quantitativa, do tipo caso e controle. O estudo foi composto por 72 indivíduos organizados em dois grupos: grupo controle (n= 35) e grupo câncer de mama (n= 37). Foram avaliados a atividade enzimática das ectonucleotidases (CD39, CD73 e ADA) em linfócitos, a quantificação sérica de ATP extracelular, o perfil de citocinas inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) e de mediadores inflamatórios (TNF e INF- γ). **Resultados:** Os resultados mostraram um aumento nas hidrólises de ATP (p=0,0273), ADP (p= 0,0358) e AMP (p=0,0060) no grupo câncer de mama. A quantificação de ATP apresentou-se aumentada no grupo câncer de mama (p=0,0002). Em relação às interleucinas, IL-2 (p=0,0013), IL-4 (p=0,0457) e o TNF (p=0,0156) mostraram-se diminuídos no grupo câncer de mama comparado ao grupo controle. **Conclusão:** Em resumo mostramos pela primeira vez alterações significativas de toda via purinérgica envolvendo a hidrólise do ATP em Ado, representado pela hidrólise aumentada de ATP, ADP e AMP em paciente com CM, além do aumento do ATP extracelular. Com isso, nossos resultados sugerem um ambiente pró- inflamatório e imunossupressor, pois sabe-se que o ATP extracelular possui função pró-inflamatória e participa ativamente da carcinogênese, enquanto as altas hidrólise de ATP, ADP e AMP podem desencadear a formação de altas concentrações de Ado, sinalizando piores desfechos na progressão do câncer e reforçando o papel do sistema purinérgico no câncer de mama. Quanto às interleucinas inflamatórias, destaca-se a diminuição do TNF e IL-2 no grupo câncer de mama, favorecendo a apoptose celular e ação anti-tumoral respectivamente, contribuindo para progressão tumoral. Contudo, nossos achados tornam-se importante para futuras pesquisas que buscam novas possibilidades terapêuticas e diagnósticas para o manejo de pacientes com câncer de mama.

Palavras-chave: Sistema purinérgico. Inflamação. Interleucinas. Câncer de mama.

ABSTRACT

Breast cancer is a multifactorial disease caused by a deregulation in the cell cycle, being considered a global public health problem due to its high incidence and high mortality rate. The cellular mechanisms involved in the process of cell evasion trigger different inflammatory and immunological processes, among these, the purinergic system, is involved in tumor development, also acting as an immunological and inflammatory modulator. Considering these cellular modulations, new diagnostic and therapeutic strategies have been studied. Objective: To evaluate the enzymatic activity of components of the purinergic system and the inflammatory profile in blood samples from individuals with breast cancer and from control individuals. Method: This is a cross-sectional, quantitative analysis, case-and-control study. The study consisted of 72 individuals divided into two groups: control group (n= 35) and breast cancer group (n= 37). The enzymatic activity of ectonucleotidases (CD39, CD73 and ADA) in lymphocytes, the serum quantification of extracellular ATP, the profile of inflammatory cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) and inflammatory mediators were evaluated. (TNF and INF- γ). Results: The results showed an increase in ATP (p=0.0273), ADP (p= 0.0358) and AMP (p=0.0060) hydrolysis in the breast cancer group. ATP quantification was increased in the breast cancer group (p=0.0002). Regarding interleukins, IL-2 (p=0.0013), IL-4 (p=0.0457) and TNF (p=0.0156) were reduced in the breast cancer group compared to the control group. Conclusion: In summary, we show for the first time significant alterations of the entire purinergic pathway involving the hydrolysis of ATP to Ado, represented by the increased hydrolysis of ATP, ADP and AMP in a patient with BC, in addition to the increase in extracellular ATP. Thus, our results suggest a pro-inflammatory and immunosuppressive environment, since it is known that extracellular ATP has a pro-inflammatory function and actively participates in carcinogenesis, while the high hydrolysis of ATP, ADP and AMP can trigger the formation of high concentrations disease, signaling worse outcomes in cancer progression and reinforcing the role of the purinergic system in breast cancer. As for inflammatory interleukins, the decrease in TNF and IL-2 in the breast cancer group stands out, favoring cell apoptosis and anti-tumor action, respectively, contributing to tumor progression. However, our findings become important for future research that seeks new therapeutic and diagnostic possibilities for the management of patients with breast cancer.

Keywords: Purinergic system. Inflammation. Interleukins. Breast cancer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1- Atividade enzimática das ectonucleotidases e ADA em linfócitos.....	36
Ilustração 2- Quantificação de ATP extracelular.....	37
Ilustração 3 - Análise de interleucinas inflamatórias.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características histológicas e imunohistoquímicas dos tumores e presença de metástase.....	35
---	----

LISTA DE SIGLAS

ADA - Adenosina Deaminase
Ado - Adenosina
ADP - Difosfato de adenosina
AURA - Aurora Kinase A
AMP - Monofosfato de adenosina
ATP - Trifosfato de Adenosina
CD39 - Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1
CD73 - Ecto-5'-nucleotidase
CM – Câncer de mama
ER - Receptor de estrogênio
EROs - Espécies reativas de oxigênio
EMT - Transição epitelial mesenquimal
E-NTPDase – Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
FISH - Hibridização *in situ* por fluorescência
HER2 - Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2
HIF-1 γ - Fator induzido por hipoxia-1
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina -1
IL-1 γ - Interleucina 1 gama
IL-2 - Interleucina 2
IL-4 - Interleucina 4
IL-6 - Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
IL-17 – Interleucina 17
IFN- γ - Interferon gama
IHQ - Imuno-histoquímica
IM – Imunomodulador
INCA – Instituto Nacional do Câncer
LAR - Receptor de andrógeno luminal
MS - Ministério da Saúde
M - Mesenquimal
MSL - Mesenquimal stem-like
MMPs - Metaloproteinases de matriz

MYC - MYeloCytomatosis
mRNA - RNA mensageiro
mAb - Anticorpo monoclonal
nm - nanômetro
N – Número
NT- Natural Killer
OMS - Organização Mundial da Saúde
RPM - Rotações por minuto
PR - Receptor de progesterona
RM - Ressonância magnética
SP - Sistema Purinérgico
TCA - Ácido tricloroacético
TNBC - Triplo negativo
TGF- γ - Fator de transformação de crescimento gama
TNF - Fator de necrose tumoral
Th17 - T-helper 17
UDP - Uridin 5' difosfato
UTP- Uridina 5' trifosfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.4.2	Objetivos Específicos.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	CÂNCER DE MAMA.....	18
2.1.1	Classificação do câncer de mama.....	19
2.1.2	Diagnóstico, fatores de risco e terapêuticas associadas ao câncer de mama.....	21
2.2	SISTEMA PURINÉRGICO E O CÂNCER DE MAMA	24
2.2.1	Sistema purinérgico como método terapêutico no câncer de mama.....	26
2.2.2	Sistema purinérgico e inflamação	28
3	METODOLOGIA.....	30
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	30
3.2	SELEÇÃO DO LOCAL E DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA	30
3.3	COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	30
3.4	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	31
3.5	DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....	32
3.6	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	32
3.6.1	Atividade da E-NTPDase (CD39) e da 5'- nucleotidase (CD73)	32
3.6.2	Atividade ADA	32
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE ATP	33
3.8	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS.....	33
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS.....	33
3.10	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
4	RESULTADOS	35
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	35
4.2	PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICO.....	36
4.3	NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINAS INFLAMATÓRIAS NO PLASMA	37
5	DISCUSSÃO	39
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
	REFERÊNCIAS	44
	APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	51

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é uma neoplasia diagnosticada frequentemente em mulheres, sendo caracterizado por um 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 estrogênio, o qual estimula a divisão das células mamárias (FORCADOS et al., 2017).

Neste contexto, no Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CM é o mais incidente em mulheres, com taxas mais altas nas regiões Sul e Sudeste. 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 (INCA, 2022). No mundo, excluídos os tumores de pele não melanoma, o CM é o mais incidente entre as mulheres, com uma taxa ajustada de incidência de 47,8 casos a cada 100 mil mulheres (GLOBOCAN, 2021).

Cerca de 80% dos casos de CM começam no epitélio do ducto mamário, após um crescimento celular desregulado dentro de qualquer um dos componentes da mama (lóbulos, ductos, tecido adiposo e tecido linfático) (ARAÚJO et al., 2021). Essa proliferação celular resulta inicialmente em tumores benignos ou mesmo carcinomas metastáticos após estimulação constante por vários fatores carcinogênicos. O microambiente tumoral, como as influências estromais ou de macrófagos, desempenha papel fundamental na iniciação e progressão do CM. Os macrófagos podem gerar um microambiente inflamatório mutagênico, que pode promover a angiogênese e permitir que as células cancerosas escapem da rejeição imune (SUN et al., 2017).

O CM atinge mulheres em todo o mundo, caracterizado por diferentes apresentações moleculares e histológicas, as quais são definitivas para o diagnóstico e definição da abordagem terapêutica (BARZAMANA et al., 2020). Considerado uma doença complexa, o câncer possui atuação na modulação do sistema imunológico, onde em condições fisiológicas é capaz de remover células anormais. No entanto, quando as células cancerígenas escapam da vigilância imunológica e começam a crescer, as células imunes se infiltram no tumor, desencadeando diferentes mecanismos imunológicos e inflamatórios de maneira desequilibrada e patológica (PASQUINI et al., 2021).

Neste contexto, diversos estudos trazem o envolvimento do sistema purinérgico (SP), na fisiopatologia do câncer, dentre esses o CM (GESSI et al., 2004; KUNZLI et al., 2011; WAN et al., 2016; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017). Por sua vez, o SP conceitua-se como uma via de regulação da homeostase imunológica, atuando através de diversas enzimas e receptores no

meio extracelular (ANTONIOLI et al., 2019).

A sinalização purinérgica envolve três componentes essenciais: nucleotídeos extracelulares, especialmente os de adenina [trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), e monofosfato de adenosina (AMP) e o nucleosídeo adenosina (Ado)], receptores específicos, através dos quais os nucleotídeos exercem seus efeitos, e as enzimas ectonucleotidases, que degradam nucleotídeos e são as responsáveis pelo controle dos níveis dessa emissão no meio extracelular (ROBSON, et al., 2006).

O ATP extracelular 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, encontrar e fagocitar células apoptóticas (GHELER et al., 2021). Além disso, o SP atua convertendo o ATP extracelular em Ado, por meio de um processo de degradação realizado principalmente pelas ectoenzimas ectonucleosídeo difosfohidrolase (NTPDase, sendo que a NTPDase 1 é conhecida como CD39) e ecto-5'-nucleotidase (CD73) (ARAÚJO et al., 2021).

A CD39 converte ATP em ADP, e este em AMP, enquanto a CD73 converte AMP em Ado. 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).

Alguns tipos de tumores são infiltrados por diferentes células imunes e podem usar a Ado como um agente imunossupressor para bloquear a resposta imune contra células cancerígenas. A Ado está envolvida no controle da inflamação e na prevenção da resposta imune exagerada, sendo esta produzida por diferentes mecanismos, onde o principal é a defosforilação dos nucleotídeos da adenina (PASQUINI et al., 2021).

Ademais, o SP é composto por diversos receptores subdivididos em duas famílias: família P1 de receptores de Ado (A1, A2A, A2B, A3) e família P2 de receptores para nucleotídeos [ATP, ADP, UTP (Uridin 5' trifosfato), UDP (Uridin 5' Difosfato) -glicose, UDP-galactose], subdivididos em família P2X (1 ao 7) e P2Y (1,2,4,6,11,12,13 e 14) (BURNSTOCK, 2017). Neste contexto, destaca-se o envolvimento das citocinas, as quais medeiam as principais interações entre células imunes e não imunes no microambiente tumoral (BRIUKHOVETSKA et al., 2021).

As citocinas são uma classe de proteínas imunorreguladoras que são secretadas em resposta a vários estímulos e agem localmente para regular muitos aspectos da fisiologia de doenças humanas. As citocinas desempenham papéis importantes na iniciação, progressão e eliminação do câncer (HOLDER et al., 2021). A inflamação crônica foi estabelecida como um

dos fatores predominantes da carcinogênese, após o evento oncogênico, a sinalização de interleucinas nas células cancerígenas pode se tornar um mecanismo patológico de crescimento tumoral, disseminação metastática e progressão do câncer (BRIUKHOVETSKA et al., 2021).

Ao todo, considerando a importância do CM no cenário da saúde, devido sua alta incidência e mortalidade, torna-se importante compreender as vias fisiopatológicas envolvidas no seu desenvolvimento, controle e também sua estreita relação com o sistema imunológico e inflamatório (ARAÚJO et al., 2021; SOLEIMANI et al., 2018). Desta forma, torna-se de grande valia entender de maneira mais abrangente os mecanismos celulares envolvendo o SP com o CM, a fim de elucidar possíveis mecanismos envolvidos na progressão tumoral, desvelando novas possibilidades diagnósticas e potenciais terapêuticos para o CM.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade enzimática de componentes do sistema purinérgico e o perfil inflamatório em amostras sanguíneas de indivíduos com CM.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterização clínica e histopatológica da amostra;
- b) Quantificar o nível sérico de ATP extracelular em indivíduos com CM e em indivíduos controle;
- c) Avaliar a atividade das ectonucleotidases nos linfócitos de indivíduos com CM e de indivíduos controle;
- d) Avaliar os níveis de citocinas inflamatórias no plasma sanguíneo de indivíduos com CM e de indivíduos controle.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

Apesar dos importantes avanços na pesquisa, o CM continua sendo um grande problema de saúde, representando uma das principais prioridades das pesquisas biomédicas (ANASTASIADI et al., 2016). Sendo responsável por um em cada quatro casos de câncer e por um em cada seis mortes por câncer, ocupando o primeiro lugar em incidência na grande maioria dos países (159 de 185 países) (SUNG et al., 2021). Em muitos casos, o diagnóstico acontece de maneira tardia (BRADEN et al., 2014).

O CM é caracterizado por um crescimento celular desregulado, ocorrendo modificações no ciclo celular, devido a alterações na informação genética, resultando inicialmente em um nódulo mamário indolor (ARAÚJO et al., 2021). É considerado uma neoplasia epitelial, heterogênea clínica e morfológicamente, de comportamento e prognóstico variado, possuindo uma ampla variedade de subtipos e distintas manifestações. Por consequência disso, cada paciente apresenta diferente resposta terapêutica com o tratamento instituído (FREITAS et al., 2019). Outro ponto importante é a capacidade de invasão de outros tecidos, denominada metástase, esse fenômeno geralmente inicia pela via linfática (SCULLY et al., 2012). Quando outros tecidos são afetados, ocorrem alterações na matriz extracelular e inicia-se o processo de angiogênese e proliferação celular metastática (ARAÚJO et al., 2021).

O biomarcador mais importante e atualmente disponível para CM é o receptor de estrogênio (ER). Todos os pacientes recém-diagnosticados com CM devem avaliar seu ER no tumor, que é um marcador de prognóstico e preditivo para terapia endócrina. Acredita-se que o estrogênio, por meio de suas associações com elementos reguladores como a ciclina D e o proto-oncogene MYeloCytomatosis (MYC), pode levar ao crescimento de células cancerosas (BARZAMANA et al., 2020). Nesse sentido, os tumores recebem diferentes classificações, as quais influenciam diretamente no plano terapêutico.

Neste contexto, os autores trazem que o CM pode ser classificado de acordo com sua histopatologia e estrutura molecular, sendo estas características de suma importância para definição do tratamento (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). Atualmente, a abordagem terapêutica advém do estadiamento do tumor, variando, desde cirurgias de ressecção até terapias de atuação ampla no organismo, como a quimioterapia e/ou radioterapia (BRASIL, 2022).

2.1.1 Classificação do câncer de mama

Os CM são heterogêneos, apresentando características morfológicas e biológicas variáveis, justificando os diferentes comportamentos clínicos em resposta ao tratamento instituído. A classificação do câncer visa fornecer um diagnóstico preciso da doença e prever o comportamento do tumor no intuito de facilitar a tomada de decisão oncológica (TSANG et al., 2019).

O estadiamento do CM é baseado no tamanho do tumor, estado nodal e metástase à distância (estadiamento TNM) (TSANG et al., 2019). Este é determinante para os planos de tratamento, fornecendo aos pacientes as estimativas sobre o prognóstico (YU et al., 2017). As recentes atualizações do estadiamento do CM pelos marcadores biológicos melhoraram a predição do diagnóstico em comparação aos estadiamentos anteriores, baseados apenas nas características anatômicas da doença, possibilitando o diagnóstico precoce e tratamento inicial breve (YUKASIEWICZ et al., 2021).

Clinicamente, subtipos específicos de CM são definidos por sua aparência histopatológica e expressão de receptores hormonais e fatores de crescimento (nomeadamente, o ER, o receptor de progesterona (PR) e o receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2; também conhecido como ERBB2) (BRITT et al., 2020).

A superexpressão de HER2 torna-se um importante marcador prognóstico em pacientes com CM. Estudos demonstraram que a amplificação e a superexpressão de HER2 estavam associadas à diminuição do tempo de recaída e à sobrevida global, independentemente do estado do linfonodo. Dados mais recentes sugerem que, além do uso prognóstico no cenário adjuvante e metastático, a superexpressão de HER2 também pode ter valor prognóstico importante em mulheres com carcinoma ductal *in situ* (BRADEN et al., 2014).

Neste contexto, os biomarcadores categorizam o CM em quatro subtipos intrínsecos principais: Luminal A, Luminal B, enriquecido com HER2 (HER2+) e o Triplo Negativo (TNBC) *basal-like* (ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). No perfil de expressão gênica, os TNBCs podem ser subdivididos em seis subtipos: basal-like (BL1 e BL2), mesenquimal (M), mesenquimal stem-like (MSL), imunomodulador (IM) e receptor de andrógeno luminal (LAR), bem como como um grupo não especificado (YUKASIEWICZ et al., 2021).

O subtipo luminal A é positivo para ER e/ou PR e negativo para HER2. O subtipo Luminal B é positivo para receptor de hormônio (ER e/ou PR) e HER2- positivo ou HER2-negativo. O subtipo TNBC é negativo para receptor de hormônio (ER e/ou PR) e negativo para HER2. Por fim, o subtipo HER2+ é negativo para receptor de hormônio (ER e PR) e positivo

para HER2 (LISON et al., 2021).

Os CM luminais são tumores ER-positivos que abrangem quase 70% de todos os casos de CM na população. Os tumores Luminais A apresentam uma baixa expressão de genes relacionados à proliferação celular, sendo que clinicamente são de baixo grau, de crescimento lento e tendem a ter um bom prognóstico. No entanto, os tumores Luminais B são de mais alto grau e têm pior prognóstico, além disso, possuem alta expressão de genes relacionados à proliferação celular, por exemplo, o marcador imunohistoquímico Ki67 e aurora kinase A (AURKA) (YUKASIEWICZ et al., 2021).

O CM pode ser classificado histologicamente em carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo, sendo subdividido em subtipos histológicos diferentes. O carcinoma *in situ* é um câncer que não se estende para além do lóbulo ou ductos onde se situa. Já no carcinoma invasivo, as células cancerosas se disseminam de dentro dos lóbulos ou ductos, e se dividem nas proximidades do tecido mamário. As células cancerosas podem se disseminar dos tecidos mamários para diferentes partes do corpo, através do sistema linfático ou da circulação sistêmica (AKRAM et al., 2017).

Os carcinomas invasivos compreendem tumores de amplo espectro que apresentam variação quanto à sua apresentação clínica, comportamento e morfologia. Quanto à classificação molecular, o CM invasivo pode ser dividido em subtipos moleculares com base nos níveis de expressão gênica (YUKASIEWICZ et al., 2021).

Os tumores TNBC constituem de 15% a 20% de todos os tipos de CM e tem um pior prognóstico. (HECHT et al., 2021). Uma vez que o TNBC necessita de tratamento mais agressivo e na maioria das vezes possui um mau prognóstico, tem havido discussões recentes sobre um sistema de estadiamento diferente para esse subtipo de CM (YU et al., 2017).

Recentemente, um novo subtipo classificado como baixa claudina (*claudin-low*) também foi identificado como TNBC (HER2, ER, PR negativos), mas difere do *basal-like* pela baixa expressão de Ki67 e alta expressão de genes relacionados à transição epitelial mesenquimal (EMT). O subtipo HER2+ exibe alta expressão de HER2 e genes de proliferação relacionados, e geralmente são negativos para ER e/ou PR (HECHT et al., 2021).

Os CM *Claudin-low* são tumores com mau prognóstico, sendo principalmente ER-negativo, PR-negativo e HER2-negativo, representando cerca de 7–14% de todos os CM invasivos, caracterizado pela baixa expressão de genes envolvidos na adesão célula-célula, incluindo claudinas 3, 4 e 7, ocludina e E-caderina. Além disso, esses tumores apresentam alta expressão de genes de transição epitelial mesenquimal (EMT) e padrões de expressão de genes semelhantes a células-tronco (YUKASIEWICZ et al., 2021).

A classificação do câncer visa fornecer um diagnóstico preciso da doença e prever o comportamento do tumor para facilitar a tomada de decisão oncológica (TSANG et al., 2019). Portanto, a classificação molecular e histológica no CM é de fundamental importância para diagnóstico e definição terapêutica adequada.

2.1.2 Diagnóstico, fatores de risco e terapêuticas associadas ao câncer de mama

Com relação ao diagnóstico, recentes estudos trazem uma diminuição significativa na mortalidade por CM nos Estados Unidos, atribuída ao constante aprimoramento tanto na mamografia de rastreamento, histórico e exame físico do paciente, quanto ao manejo adequado. A realização do autoexame das mamas é controversa porque a vantagem em condições de redução de óbitos não foi visualizada. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), melhorar os resultados e a sobrevivência do CM pela detecção precoce continua sendo a base mais importante na prevenção e tratamento da doença (AKRAM et al., 2017).

A mamografia é um método de triagem eficaz, e utiliza raios-X de baixa energia para obter imagens de alta resolução da mama, e não requer nenhum agente de aumento de contraste. Outro exame de imagem utilizado é a ressonância magnética (RM), sendo mais sensível que a mamografia em mulheres de alto risco, especialmente na detecção do carcinoma ductal invasivo. Comparada à mamografia, a RM não é afetada pela densidade da mama e tem vantagens na detecção do CM primário oculto. Considerando sua sensibilidade, a RM pode ser uma escolha útil em grupos de alto risco, quando os resultados da mamografia são normais (SUN et al., 2017).

Ainda, com relação a mamografia, este é o exame padrão ouro para o rastreamento e detecção precoce do CM. Atualmente não há biomarcadores recomendados para uso diagnóstico de rotina, embora vários estejam em desenvolvimento. Todas as mulheres com anormalidades mamográficas suspeitas de malignidade com base na pontuação radiográfica do BI-RADS devem ser submetidas a biópsia da mama. Adendo a isso, os biomarcadores diagnósticos seriam particularmente úteis em mulheres com resultados de biópsia indeterminados (BRADEN et al., 2014).

A imuno-histoquímica (IHQ) tornou-se um componente importante no diagnóstico do CM. Embora a coloração com hematoxilina e eosina seja a base primária para o diagnóstico das patologias da mama, os exames imunohistoquímicos fornecem informações valiosas que auxiliam no diagnóstico diferencial dos diferentes tipos de CM, especialmente em relação aos subtipos moleculares (AKRAM et al., 2017).

A expressão proteica de HER2 é avaliada por IHQ, através do uso de anticorpos que reconhecem o domínio extracelular do receptor. Já a amplificação do gene é avaliada pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Inicialmente é realizada a análise por IHQ, sendo possíveis os seguintes resultados: score 0 (ausência de marcação da membrana citoplasmática ou marcação em 10% das células neoplásicas), score 2+ (marcação de intensidade ligeira a moderada, de toda a membrana em >10% das células neoplásicas), score 3+ (marcação intensa de toda a membrana em >10% das células neoplásicas). Os casos com score 0 e 1+ são considerados negativos. Os casos 3+ são considerados positivos, e as pacientes são elegíveis para terapia adjuvante. Os casos 2+ necessitam de avaliação subsequente por FISH, que determinará se são positivas (com amplificação do gene) ou negativas (sem amplificação do gene) (SAUDADE, TOMÁS e FONSECA, 2005).

A medição do Ki67 antes e durante o tratamento é considerada informativa na previsão da eficácia terapêutica. Altos níveis pré-tratamento de Ki67 foram encontrados para correlacionar com a resposta à quimioterapia em mulheres com CM. Após o início do tratamento, a avaliação seriada do Ki67 pode dar alguma indicação da eficácia do tratamento, onde níveis mais altos de Ki67 após o início do tratamento podem ser indicativos de redução da sobrevida da doença (BRADEN et al., 2014).

Quanto aos fatores de risco relacionados ao CM, se destaca principalmente o sexo feminino, idade avançada, nível de estrogênio, histórico familiar, presença de mutações genéticas específicas e estilo de vida. Nesse contexto, os autores nos trazem que além do sexo feminino, o envelhecimento é um dos fatores de risco mais importantes para o CM, pois a sua incidência está altamente relacionada ao aumento da idade. Além disso, um quarto de todos os casos de CM está relacionado à história familiar. As mulheres, cuja mãe ou irmã tiveram CM, são mais propensas a esta doença (SUN et al., 2017).

O sexo feminino constitui um dos principais fatores associados a um risco aumentado de CM devido à estimulação hormonal, pois as mulheres têm células mamárias que são muito vulneráveis ao estrogênio e progesterona, já os homens apresentam níveis insignificantes de estrogênio. O estrogênio e andrógenos circulantes estão positivamente associados a um aumento de risco de CM (YUKASIEWICZ et al., 2021).

Fatores reprodutivos como a menarca precoce, menopausa tardia, idade avançada da primeira gravidez e baixa paridade podem aumentar o risco de CM. O estrogênio endógeno é geralmente produzido pelo ovário em mulheres na pré-menopausa, diante disso, a ooforectomia pode reduzir o risco de CM (SUN et al., 2017).

As pacientes com histórico de câncer de ovário, endométrio ou cólon têm risco maior

de desenvolver CM. Uma mulher que teve CM tem um risco aumentado de recorrência da doença na outra mama. Além disso, o CM ocorre principalmente em mulheres obesas, pois a gordura corporal também está envolvida na síntese de estrona, um tipo de estrogênio (AKRAM et al., 2017).

A prática de atividade física atua como um fator de prevenção do CM, pelo fato de reduzir a exposição aos hormônios sexuais endógenos, alterando as respostas do sistema imunológico ou os níveis do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1). Pesquisas afirmam que o consumo excessivo de álcool é um fator ligado ao risco de desenvolver CM, assim como o uso de tabaco (YUKASIEWICZ et al., 2021).

O consumo de álcool pode elevar o nível de hormônios relacionados ao estrogênio no sangue e desencadear as vias do ER. Dieta com a ingestão excessiva de gordura, especialmente a gordura saturada, está associada à mortalidade e mau prognóstico em pacientes com CM (SUN et al., 2017).

Atualmente, existem diversas terapêuticas para o CM, onde o tratamento depende em que fase que a doença se encontra e o tipo do tumor. O tratamento tradicional inclui mastectomia e/ou tumorectomia associada ao tratamento pós-operatório adjuvante. A conduta habitual nas fases iniciais (estádios I e II) do câncer de mama é a cirurgia, que pode ser conservadora (retirada apenas do tumor) ou mastectomia (retirada da mama) parcial ou total. Para pacientes com tumores maiores que 5 cm (estádio III), é realizado o tratamento sistêmico com quimioterapia, e após segue-se com o tratamento local com cirurgia e radioterapia. Na fase da metástase (estádio IV), é fundamental buscar o equilíbrio entre o controle da doença e o possível aumento da sobrevida (BRASIL, 2022).

Dentre as possibilidades terapêuticas emergentes utilizadas para o tratamento do CM, está o gerenciamento do ciclo celular, via de sinalização e terapia de alvo molecular, anticorpos monoclonais anti HER2, conjugados anticorpo-droga e imunoterapia (BARZAMANA et al., 2020). Todas as abordagens acima mencionadas estão no início do caminho, sendo hoje a quimioterapia sistêmica considerada o padrão-ouro para a maioria dos tipos de câncer, no entanto, a resistência à terapia representa um grande problema e a melhoria substancial nas taxas de sobrevivência precisa continuar sendo investigado (ANASTASIADI et al., 2016).

Contudo, o estabelecimento de programas de prevenção primária do CM continua sendo um desafio de saúde pública. Os esforços para diminuir o excesso de peso corporal e o consumo de álcool, e incentivar a atividade física e o aleitamento materno, podem ter um impacto na redução da incidência do CM em todo o mundo. Os programas de rastreamento de CM em toda a população visam reduzir a mortalidade por CM por meio da detecção precoce e tratamento

eficaz (SUNG et al., 2021).

A recorrência e a metástase são as principais causas de morte em pacientes com CM. Com isso, as pesquisas surgem com novas teorias para explicar esses comportamentos malignos e auxiliar no diagnóstico precoce e terapêutica menos invasiva. O SP parece estar envolvido neste processo, promovendo o crescimento e a metástase do CM por meio de mecanismos imunes ou não imunes (YU et al., 2016). Assim, pesquisas que buscam entender os mecanismos do SP com o intuito de bloquear e/ou minimizar estes processos, vem ao encontro de novas medidas terapêuticas ou diagnóstico precoce.

2.2 SISTEMA PURINÉRGICO E O CÂNCER DE MAMA

O SP 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 espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando ocorre algum tipo de lesão celular, os mediadores purinérgicos são liberados no espaço extracelular, como ATP e Ado, atuando como moléculas sinalizadoras (ARAÚJO et al., 2021).

Esse sistema é composto por diversas enzimas que atuam na hidrólise do ATP. São elas enzimas moduladoras como a NTPDase (sendo a NTPDase 1 também conhecida como CD39), que hidrolisa ATP em ADP e ADP em AMP. Já a CD73 hidrolisa AMP em Ado. Por fim, a adenosina desaminase (ADA) hidrolisa a Ado em inosina (BOISON, 2012).

O metabolismo das purinas é realizado pela enzima CD39, que converte ATP em AMP de maneira dependente de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Sua expressão é regulada por hipóxia, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias. A expressão aumentada de CD39 foi encontrada em vários tumores sólidos, o que sugere o envolvimento desta proteína na progressão neoplásica, tanto no início da angiogênese como na progressão da neovascularização (ARAÚJO et al., 2021).

Os nucleotídeos ATP, ADP e AMP funcionam como moduladores pró-inflamatórios na sinalização extracelular (BURNSTOCK, 2018). O ATP, quando acumulado no meio extracelular, promove a migração de células inflamatórias e diferenciação de células T helper (Th), ocorrendo ativação do inflamassoma NLRP3, produção de citocinas e quimiocinas e a citotoxicidade (DI VIRGILIO; SARTI; COUTINHO-SILVA, 2020).

O ATP atua como um sinal de alerta, ativando as células imunes para combater microorganismos, iniciar respostas de reparo tecidual e encontrar e fagocitar células apoptóticas. Nucleotídeos (ATP, ADP, UTP e UDP) e nucleosídeo (Ado) são caracterizados

como mensageiros extracelulares, presentes em condições normais. Sua liberação exacerbada é causada por diferentes agentes estressores, como danos à membrana plasmática, agregação plaquetária, infecções virais ou bacterianas e estresse mecânico (GHELER et al, 2021).

A ADA funciona como catalisadora das reações de desaminação da Ado, ou seja, é capaz de hidrolisar Ado em inosina (BOISON, 2012). Por outro lado, a Ado pode atuar como uma molécula anti-inflamatória, tendo fortes efeitos imunossupressores (DI VIRGILIO; SARTI; COUTINHO-SILVA, 2020). A enzima CD73 e a Ado têm papéis fisiológicos na manutenção e restauração da homeostase tecidual. Portanto, levantamos a hipótese de que o sistema purinérgico pode oferecer novas oportunidades para interferir nas respostas normais do tecido e do tumor (LEVE et al., 2019).

Além disso, a CD73 é amplamente distribuída em tecidos normais e é frequentemente regulada positivamente em vários tumores, incluindo o CM. A ação da CD73 promove a ocorrência e o desenvolvimento do CM por meio de evasão imune e outros mecanismos extracelulares. Os autores também apontam que a CD73 aumenta significativamente o crescimento e a metástase do CM através de vias de sinalização relacionadas à Ado. Como um novo alvo, a CD73 tem aplicações amplas e promissoras no diagnóstico e tratamento do CM (YU et al., 2017).

Independente de sua função imunossupressora, a Ado derivada da ação da CD73 também promove metástase de células tumorais e angiogênese tumoral. A enzima CD73 e os receptores de Ado estão emergindo como alvos terapêuticos atraentes para promover respostas imunes antitumorais. A CD73 é expressa na superfície de células tumorais, células estromais e células imunes, onde catalisa a hidrólise do AMP em Ado. 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 de Ado, como A2A e A2B (BUISSERET et al., 2017).

Ademais, a sinalização purinérgica é composta por receptores purinérgicos, nucleosídeo e nucleotídeos de adenina e ectonucleotidases. Os receptores são classificados em quatro receptores de Ado (P1) acoplados à proteína G (A1, A2A, A2B, A3), e a família P2, com sete subtipos de receptores de canais iônicos para nucleotídeos P2X (P2X1-7) e oito subtipos de receptores acoplados a proteínas G para nucleotídeos P2Y (P2Y1, 2, 4, 6, 11–14). Os receptores P2X são canais catiônicos triméricos com dois domínios transmembrana, apresentando sete subunidades que interagem para produzir complexos homo e heterotriméricos funcionais (FRANCIOSI et al., 2022). A família P1 faz a mediação das reações da Ado, e os subtipos mais expressos nas células tumorais são A3 e A2B (ARAÚJO et al., 2021).

A família P2 tem como principal agonista o ATP. Os receptores P2X são altamente expressos em células β pancreáticas e entre células imunológicas, tais como linfócitos, monócitos e células dendríticas, o que firma a sua contribuição para estados inflamatórios (BURNSTOCK, 2018; RALEVIC; DUNN, 2015; ZHOU et al., 2020).

Os receptores P2Y são metabotrópicos, e cada um deles tem afinidade com algum agonista. Por exemplo, ATP e ADP são agonistas de P2Y1, ATP e UTP têm maior afinidade com P2Y2, UTP com P2Y4, UDP com P2Y6, ATP com P2Y11, ADP com P2Y12 e P2Y13, e as moléculas UDP-glicose e UDP-galactose têm maior afinidade com P2Y14 (BURNSTOCK, 2007; DI VIRGILIO et al., 2017). No CM a sinalização purinérgica e seus receptores atuam na diminuição da motilidade das células tumorais e induzem migração e metástase, respectivamente (ARAÚJO et al., 2021).

Sabe-se do envolvimento do SP nas modulações celulares que ocorrem no CM, no entanto, a compreensão dessa heterogeneidade complexa é crucial para minimizar os efeitos da tumorigênese e a metástase mamária (ANASTASIADI et al., 2017). Com isso, entender os métodos terapêuticos já existentes e buscar novas abordagens terapêuticas é de fundamental importância para um prognóstico favorável no CM.

2.2.1 Sistema purinérgico como método terapêutico no câncer de mama

O SP está fortemente envolvido com a fisiopatologia do CM. Por meio de diferentes vias de sinalização intracelular, os receptores purinérgicos promovem ações relacionadas à progressão e invasão em diferentes linhagens no CM. Nesse sentido, a relação entre o CM e o SP pode ser considerada a base de futuras opções terapêuticas, uma vez que os receptores purinérgicos podem estar envolvidos na progressão e invasão das células no CM, além de promover inibição e controle do crescimento tumoral. Assim, vários componentes do SP tornaram-se opções terapêuticas promissoras a serem estudadas (ARAÚJO et al., 2021).

Gheler e colaboradores (2021) afirmam que o SP tem um papel crucial no desenvolvimento do câncer, podendo atrapalhar tentativas do organismo de vencê-lo. Que a Ado tem ação anti-inflamatória, além disso, o antagonismo de CD39 pode estabilizar o ATP pró-inflamatório extracelular para restaurar a imunidade antitumoral. A Ado ativa os receptores purinérgicos P1 (A2A e A2B) e limita as funções das células T efetoras. Ainda, níveis aumentados de CD73 sérico podem indicar uma expressão aumentada de CD73 no microambiente tumoral, provavelmente como consequência de inflamação/hipóxia associada ao tecido.

Evidências mostram que a regulação positiva de CD73 está vigorosamente envolvida na progressão do tumor de mama, afetando proliferação, angiogênese, imunossupressão, metástase e resistência à quimioterapia. Especialmente, o papel desta ectonucleotidase na tumorigênese é demonstrado por estudos *in vitro* e *in vivo* usando linhagens celulares. Terapia de direcionamento de CD73 com anticorpo monoclonal (mAb) ou outros agentes terapêuticos mostrou efeitos antitumorais desejáveis no modelo animal sozinho ou em combinação com drogas imunoterapêuticas e convencionais (SOLEIMANI et al., 2019).

As ações imunossupressoras de CD73 e Ado no microambiente tumoral estão estabelecidos, atraindo grande atenção como um alvo terapêutico, combinado particularmente com imunoterapia. A inibição terapêutica do receptor A2A também foi capaz de modular a expressão de receptores co-inibitórios de células T e melhorar a função efetora para maior eficácia do bloqueio de *checkpoint* imunológico e terapia celular adotiva em modelos de câncer murino (LEVE et al., 2019).

Em relação especificamente aos receptores purinérgicos, sabe-se que o silenciamento ou bloqueio farmacológico de P2X7 é uma opção viável, pois demonstrou inibir a invasão metastática e a disseminação. Quanto aos receptores P2Y, as perspectivas de correlação entre UTP/P2Y6 e UTP/P2Y2 são favoráveis, assim como bloqueadores de P2Y12, como o ticagrelor. O receptor P2Y2 promove a migração de células tumorais, bem como alterações de expressão impulsionadas por ATP em genes relacionados à EMT. O papel crítico do receptor P2Y2 indica que ele pode ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento do CM. No entanto, existem vários subtipos de receptores P2Y expressos em células no CM, ativados possivelmente pelo ATP (QIU et al., 2017).

O ATP extracelular abundante no microambiente tumoral promove o fluxo de Na⁺, Ca²⁺ e outros cátions ativando o receptor P2X7. O resultado leva ao aumento da produção de ATP, diminuição do pH e, por fim, apoptose celular tumoral por meio da imunossupressão. Portanto, o P2X7 é um alvo farmacêutico para a prevenção e tratamento da neoplasia epitelial devido à sua capacidade de induzir a apoptose (PFAFFENZELLER; FRANCIOSI; CARDOSO, 2020). Ainda, a inibição do receptor A1 favorece a apoptose, os antagonistas de A2B diminuíram a metástase do CM para o pulmão, e os agonistas de A3 levaram à diminuição do crescimento e proliferação de células cancerosas da mama (ARAÚJO et al., 2021).

Considerando os múltiplos papéis do SP no desenvolvimento do câncer, em especial o CM, o papel significativo da Ado derivada da atividade de CD73 no escape da vigilância pelo sistema imune e no processo de metástase, o direcionamento para CD73 tem sido considerado como um candidato apropriado na terapia do CM. A terapia de direcionamento de CD73 com

mAb ou outros agentes terapêuticos mostrou efeitos antitumorais desejáveis no modelo animal sozinho ou em combinação com drogas imunoterapêuticas convencionais (SOLEIMANI et al, 2019).

Portanto, as alterações observadas nas ectonucleotidasas podem influenciar a ativação dos receptores purinérgicos e o aumento nos níveis de ATP associados a uma regulação negativa de ectonucleotidasas, exacerbando a ativação de alguns receptores responsáveis pela inflamação em outras células (DIEZMOS et al., 2016). Neste sentido, estudos trazem que as ectonucleotidasas CD39 e CD73 influenciam na regulação do sistema imunológico e geram um microambiente tumoral imunossuprimido. Por outro lado, os receptores purinérgicos envolvidos na fisiopatologia do câncer, como o P2X7, demonstraram influenciar a geração de um ambiente pró-inflamatório (FRANCIOSI et al., 2022).

2.2.2 Sistema purinérgico e inflamação

A inflamação é resultante de uma interação complexa entre células imunes e inúmeros mediadores solúveis com o objetivo de proteger o organismo de estímulos nocivos, como infecções por microrganismos, células danificadas ou irritantes, além de ser um forte componente de muitas condições patológicas, como doenças reumáticas, doenças neurológicas e câncer. Em níveis elevados de inflamação ocorre um aumento da demanda metabólica, resultando em hipóxia e lesão tecidual (PASQUINI et al., 2021).

A sinalização purinérgica está envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, como proliferação celular e regeneração tecidual, neurotransmissão e inflamação. Os receptores de Ado, ATP e outros membros da via de sinalização, como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), também estão envolvidos neste processo. No compartimento extracelular, o ATP ativa a sinalização purinérgica via canal iônico e receptores purinérgicos transmembrana (GRATAL et al., 2020).

O envolvimento do ATP no que tange a ativação dos receptores purinérgicos na fisiopatologia das doenças inflamatórias é um tema recorrente e tem sido estudado amplamente. Sabe-se que os receptores purinérgicos desempenham um papel importante na inflamação, pois estão envolvidos na apoptose celular, onde sua ativação promove inflamação, aumentando a liberação de citocinas inflamatórias e de células imunes (DIEZMOS et al., 2016).

Nesse sentido, concentrações extracelulares variadas de diferentes metabólitos purinérgicos, como ATP, ADP e Ado, são indicadores confiáveis do estado do tecido durante a inflamação, envolvendo um robusto sistema regulador da resposta imune. No entanto,

concentrações elevadas de ATP são geralmente um sinal de alerta de morte celular detectada por células imunes em locais de inflamação ativa. Assim, resalta-se a Ado como um potente modulador da inflamação e das respostas imunes, pois regula algumas funções de proliferação e ativação das células imunes (GRATAL et al., 2020).

Dessa maneira, muitos estudos demonstraram que a superexpressão intratumoral de ectonucleotidases pode ser causada principalmente por hipóxia e inflamação. A ativação do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1 γ), bem como as vias de sinalização desencadeadas por mediadores pró- inflamatórios (interleucina 1 gama (IL-1 γ), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), fator de transformação de crescimento gama (TGF- β), podem aumentar os níveis de CD39 e CD73 (PASQUINI et al., 2021). Com isso, ocorre a ativação de células do sistema imune e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL), IL-1 γ , IL-6, IL-8 e TNF, as quais favorecem o desenvolvimento e progressão tumoral (FRANCIOSI et al., 2022).

Nesta perspectiva do envolvimento do SP com os processos inflamatórios, podemos destacar o linfócito T-helper 17 (Th17), o qual é um tipo de linfócito CD4+, caracterizado pela alta produção de interleucina-17 (IL-17) e outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-21, IL-22 e IL-26. O Th17 tem sido associado à carcinogênese em diversos tipos de tumores (FRANCIOSI et al., 2022). A ligação entre ATP e células Th17 pró-inflamatórias também foi recentemente confirmada por estudos que mostram que a ativação de P2X7 através de ATP favorece um meio de citocinas que promove células Th17. Consequentemente, níveis aumentados de ectonucleotidase estão associados com geração aumentada de Ado e com supressão por Th17 de células de imunidade antitumoral CD4+ e CD8+ (ALLARD et al., 2017).

De fato, nas células cancerígenas há comumente um nível aumentado de ATP e consequentemente de Ado, acompanhado por superexpressão de CD39 e CD73, limitando assim a atividade das células imunes no microambiente tumoral. Portanto a Ado, por meio da interação com seus quatro subtipos de receptores, atua como um modulador onipresente e importante nos processos inflamatórios, afetando quase todas as funções fisiológicas e fisiopatológicas (PASQUINI et al., 2021).

Neste trabalho discutiremos a relação do SP com o CM e os efeitos que as interleucinas inflamatórias exercem nesse sistema.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo transversal, de análise quantitativa, do tipo caso e controle. Foram avaliadas a atividade das ectonucleotidases (através da hidrólise de ATP, ADP e AMP) e da ADA em linfócitos, a quantificação sérica de ATP e a expressão plasmática de interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6 e IL10) e mediadores inflamatórios (TNF e INF- γ), em um total de 72 indivíduos organizados em dois grupos: grupo controle (n= 35) e grupo CM (n= 37), previamente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico.

3.2 SELEÇÃO DO LOCAL E DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

O estudo compreendeu mulheres com diagnóstico de CM, previamente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico, admitidas para procedimento cirúrgico no Hospital referência da região. O grupo controle foi selecionado através de busca ativa aleatória e contato prévio, em seus domicílios, igrejas e centros comunitários.

Dessa maneira, foram incluídos no grupo CM: mulheres procedentes do oeste de Santa Catarina; maiores de 18 anos, diagnosticadas por médico especialista com carcinoma mamário invasor- CID: C50 e que não haviam sido submetidos a procedimentos cirúrgicos para retirada do tumor ou a terapia neoadjuvante (quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia, terapia de precisão), sendo excluídas mulheres com história prévia de qualquer tipo de câncer. No que concerne ao grupo controle, essas foram incluídas com base no pareamento por idade (três anos a mais ou a menos) e sexo feminino, sem diagnóstico passado ou atual de câncer de qualquer tipo.

3.3 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas do grupo CM foram realizadas no dia do procedimento cirúrgico através do contato pessoalmente com as pacientes, em sala reservada do bloco cirúrgico do hospital de referência, para explicar o projeto e para assinatura do TCLE. Conforme concordância com os objetivos da pesquisa, no pré ou no ato operatório foram coletadas amostras sanguíneas das pacientes por profissional qualificado. Além disso, foram coletadas informações clinicopatológicas dos prontuários médicos das pacientes, no setor de arquivo do Hospital, as

quais foram utilizadas para complementar as análises biológicas.

Para o grupo controle foi realizada busca ativa através de mídias eletrônicas. As intervenções foram agendadas e aconteceram nas respectivas residências dos voluntários, em igrejas e centros comunitários, sendo as coletas realizadas por um profissional da enfermagem habilitado. As informações como idade e histórico médico foram levantados pelos pesquisadores em uma entrevista prévia anterior à coleta de sangue, sendo observado os critérios de inclusão e exclusão e posteriormente a assinatura do TCLE.

O material biológico, 20 ml de sangue total, foi coletado em ambos os grupos em tubos vacutainer com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), utilizados para separação de linfócitos e plasma, e em tubos com gel ativador de coágulo para o soro. Posteriormente, transportados sob refrigeração ao laboratório de pesquisa da UFFS, onde foram processados.

No que concerne à separação de linfócitos, as amostras de sangue coletadas com EDTA foram diluídas em volume igual de solução salina. Posteriormente, a amostra diluída foi transferida para um tubo cônico contendo Lymphoprep (Ficol-Histopaque), seguida de centrifugação a 1800 rotações por minuto (rpm), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após a centrifugação, houve a formação de um gradiente de densidade. Neste, formou-se uma camada intermediária composta pelas células mononucleares (linfócitos e monócitos) entre as camadas de plasma e Ficol. Esta nuvem de células foi cuidadosamente retirada com pipeta de Pasteur sobre a camada superior (plasma) e transferida para tubo cônico limpo. Sobre as células foi acrescentada solução salina seguida por centrifugação de 10 minutos a 1500 rpm. Em seguida, descartamos o sobrenadante e acrescentamos salina até a lavagem das células e remoção das plaquetas. Quando necessário foi acrescentado tampão hemolítico EDTA-Cloreto de Amônio para remoção das hemácias.

Para separar soro e plasma, inicialmente os respectivos tubos foram centrifugados a 3.500 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação foi coletado utilizando uma pipeta de Pasteur apenas o soro e o plasma dos respectivos tubos, depositando separadamente em dois tubos já identificados como soro e plasma. As amostras foram congeladas em freezer a -80 °C para posteriores análises bioquímicas.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Realizada a partir das informações clinicopatológicas obtidas através da consulta aos prontuários das pacientes com CM, essas abrangeram a idade, subtipo histológico e molecular do tumor, tamanho do tumor, grau do tumor, metastases em linfonodos, mestastases a distância,

receptores imunohistoquímicos tumorais, história familiar de câncer, comorbidades (hipertensão, síndrome metabólica, diabetes, entre outras).

3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Para dosagem de proteínas foi utilizado o método de Bradford em comassie (BRADFORD, 1976). Inicialmente foi preparado o reagente azul de comassie, filtrado e armazenado em frasco âmbar. Em seguida foi determinado o Fator de correção, utilizando uma curva de albumina bovina como padrão. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 595 nanômetro (nm). As proteínas foram ajustadas nas faixas de 0,1– 0,2 mg/ml para amostras de linfócitos, utilizando solução salina quando necessário.

3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.6.1 Atividade da E-NTPDase (CD39) e da 5'- nucleotidase (CD73)

A atividade das enzimas CD39 e CD73 foi determinada conforme Leal e colaboradores (2005). Resumidamente, após ajuste de proteínas, 20 uL de amostra (linfócitos, soro) foi adicionada à mistura de reação de cada enzima e pré- incubada a 37°C por 10 minutos. A reação enzimática foi iniciada pela adição dos substratos específicos para cada enzima: ATP e ADP para CD39, e AMP para CD73. Após incubação a 37 °C por 70 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de ácido tricloroacético (TCA, 10%), e o fosfato inorgânico liberado devido à hidrólise de ATP, ADP e AMP foi determinado usando verde de malaquita como agente colorimétrico. Uma curva padrão foi preparada com KH_2PO_4 . Os controles foram realizados para corrigir a hidrólise não enzimática. A absorbância foi medida a 630 nm.

3.6.2 Atividade ADA

A atividade da enzima ADA foi determinada de acordo com Giusti e Galanti (1984). O processo é dividido em fase I (reação enzimática), fase II (reação colorida) e fase III (dosagem da atividade). Na fase I foi adicionado 30 uL de amostra e em seguida foi aplicada a solução de Ado. No branco da amostra foi adicionado tampão fosfato. As reações foram incubadas à 37 °C por 60 minutos. Na fase II, foram adicionados fenol/nitropussiato e hipoclorito às amostras, no branco da amostra foi adicionado Ado e incubado à 37 °C por 30 minutos. Por fim, na fase III

foi realizado a leitura das absorvâncias a 620 nm. Uma curva padrão foi preparada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE ATP

As análises de quantificação de ATP extracelular foram realizadas com o kit *ATP Determination* (Invitrogen ®) seguindo as instruções do fabricante. O material biológico utilizado foi o soro. O ensaio é baseado na exigência absoluta da luciferase para ATP na produção de luz (emissão máxima 560 nm em pH 7,8). Este ensaio é extremamente sensível. Ademais, a análise de luminescência foi realizada utilizando um leitor de microplacas Varioskan (ThermoScientific ®).

3.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

Para determinação dos parâmetros inflamatórios, os níveis de INF- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 foram analisados em amostras de plasma utilizando o kit comercial CBA (*Cytometric Brad Array*) Kit II, para citocinas humanas de perfil Th1/Th2 da BD Biosciences™ (San Diego, CA, EUA – Catálogo: 551809). O procedimento experimental consiste na preparação de um mix de citocinas utilizando seis populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência, seguido da adição da amostra e da conjugação com anticorpo de captura específico, após período de incubação, as amostras foram capturadas em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus (San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos foram analisados pelo CBA Analysis Software (BD Biosciences™) pelo cálculo da equação da reta utilizando os valores obtidos na curva padrão.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.0 (San Diego, California, USA). Os outliers foram removidos previamente e, em seguida, o teste não paramétrico de Mann Whitney foi usado devido aos tamanhos amostrais heterogêneos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados são apresentados como mediana, intervalo de confiança de 95% e tamanho da amostra (n).

Para as análises de correlação foi utilizado o teste de correlação de Pearson, que pressupõe distribuição normal das duas amostras e comportamento linear da relação entre as variáveis (MIOT, 2018).

3.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A presente pesquisa 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. Os indivíduos participantes assinaram o TCLE antes de iniciar sua participação na pesquisa.

Todos os participantes da pesquisa foram advertidos acerca dos riscos e benefícios trazidos pela sua participação e pelo procedimento de coleta, sendo que dados pessoais foram mantidos em sigilo e cada participante foi identificado por um número distinto. Durante o desenvolvimento da pesquisa, que compreendeu os anos de 2021 a 2023, o material coletado ficou em posse da pesquisadora responsável e está sendo mantido em armário com cadeado, na sala da pesquisadora, ou em freezer no laboratório de pesquisa nas dependências da UFFS *campus* Chapecó, o qual apenas os pesquisadores envolvidos têm acesso.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No estudo participaram 74 indivíduos do sexo feminino, os quais foram estratificadas em grupo CM, 37 indivíduos, e grupo controle, 35 indivíduos. A análise estatística foi realizada por teste Mann-Whitney, * $p < 0,05$. A média de idade das participantes com CM foi de $58,30 \pm 12,55$ anos, e dos controles foi de $59,11 \pm 12,79$ anos, não diferindo estatisticamente ($p=0,7910$).

A caracterização histológica e imunohistoquímica dos tumores nas pacientes com CM, bem como a distribuição quanto a presença de metástase, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Características histológicas e imunohistoquímicas dos tumores e presença de metástase

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	PACIENTES (n=37)
Características gerais:	
Idade média \pm desvio padrão da idade	58,30 \pm 12,55 anos
Tipo histológico do tumor [n (%)]:	
Carcinoma ductal invasivo	10 (25,64%)
Carcinoma invasivo não especificado	21 (53,84%)
Carcinoma mucinoso	1 (2,5%)
Sem informação	5 (17,94%)
Grau histológico [n (%)]:	
Grau 1	4 (10,25%)
Grau 2	21 (53,84%)
Grau 3	5 (12,82%)
Sem informação no prontuário	7 (23,07%)
Metástase nos linfonodos [n (%)]:	
Não	21 (53,84%)
Sim	3 (7,6%)
Sem informação no prontuário	9 (28,20%)
Metástase à distância [n (%)]:	
Não	16 (41,02%)
Sim	2 (5,12%)
Sem informação no prontuário	13 (38,46%)
Imuno-histoquímica ER e/ou PR [n (%)]:	
Negativo	6 (15,38%)
Positivo	22 (56,41%)
Sem informação no prontuário	9 (28,20%)
HER2 [n (%)]:	
Negativo	22(56,41%)
Positivo	8 (20,51%)
Sem informação no prontuário	7 (23,07%)
Tipo de tumor [n (%)]:	
Luminal A	12 (30,76%)
Luminal B	13 (33,33%)
TNBC	1 (2,5%)
Sem informações em prontuário	11 (33,33%)

Legenda: ER, receptor de estrogênio; PR, receptor de progesterona; TNBC, câncer de mama triplo negativo;

Determinação de receptores e proteína pela técnica de imuno-histoquímica; Demais dados clínico patológicos coletados a partir de prontuários.

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

4.2 PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICO

A atividade de CD39 foi avaliada pela hidrólise de ATP e ADP, enquanto a atividade de CD73 foi avaliada pela hidrólise de AMP. A figura 1 apresenta os dados da hidrólise de ATP (A), ADP (B), AMP (C) e a atividade da ADA (D) em linfócitos do grupo CM quando comparados com o grupo controle.

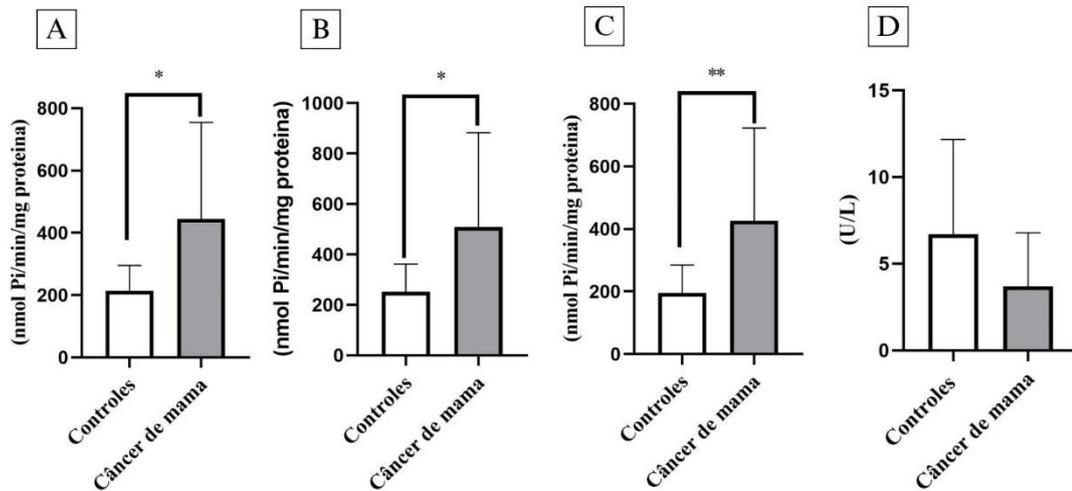


Figura 1: A. A hidrólise de ATP foi significativamente maior nos linfócitos do grupo CM nos linfócitos do grupo CM (444,4 nmol Pi/min/mg de proteína; 310,9 a 83,10 nmol Pi/min/mg de proteína; n=14) quando comparados com os do grupo controle (214,5 nmol Pi/min/mg de proteína; 81,36 a 310,9 nmol Pi/min/mg de proteína; n=20). Valor de p=0,0273. **B.** A hidrólise de ADP foi significativamente maior nos linfócitos do grupo CM nos linfócitos do grupo CM (510,0 nmol Pi/min/mg de proteína; 373,0 a 96,31 nmol Pi/min/mg de proteína; n=15) quando comparados com os do grupo controle (251,1 nmol Pi/min/mg de proteína; 110,8 a 24,18 nmol Pi/min/mg de proteína; n=21). Valor de p=0,0358. **C.** A hidrólise de AMP foi significativamente maior nos linfócitos do grupo CM (426,5 nmol Pi/min/mg de proteína; 296,5 a 74,12 nmol Pi/min/mg de proteína; n=16) quando comparados com os do grupo controle (195,2 nmol Pi/min/mg de proteína; 89,70 a 20,06 nmol Pi/min/mg de proteína; n=20). Valor de p=0,0060. **D.** A atividade da ADA não apresentou diferença estatisticamente significativa nos linfócitos dos indivíduos do grupo CM (3,707U/L; 3,082 a 0,6892; n= 20) quando comparados com os do grupo controle (6,706 U/L; 5,460 a 0,9505 U/L; n= 33). Valor de p=0,0551. Os dados foram apresentados como mediana e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança a 95%.

A figura 2 apresenta níveis extracelulares de ATP no soro do grupo CM quando comparados com o grupo controle.

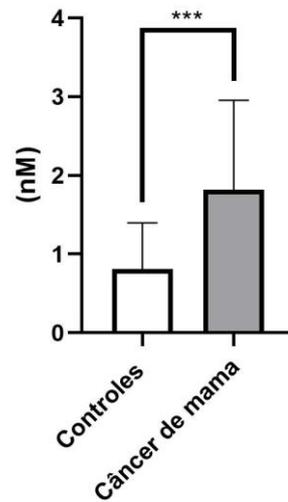
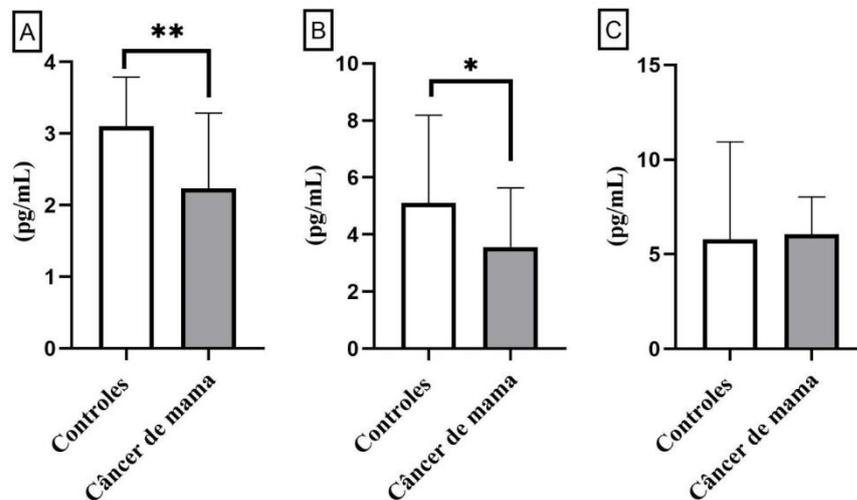


Figura 3: A quantificação extracelular de ATP foi significativamente maior no grupo CM (1,68 nM; 1,18 a 2,33 nM; n= 31) em comparação ao grupo controle (0,65 nM; 0,47 a 1,11 nM; n= 29). Valor de p=0,0002. Os dados foram apresentados como mediana e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança a 95%.

4.3 NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINAS INFLAMATÓRIAS NO PLASMA

A figura 3 apresenta a análise das interleucinas inflamatórias no plasma de indivíduos do grupo CM quando comparados com o grupo controle.



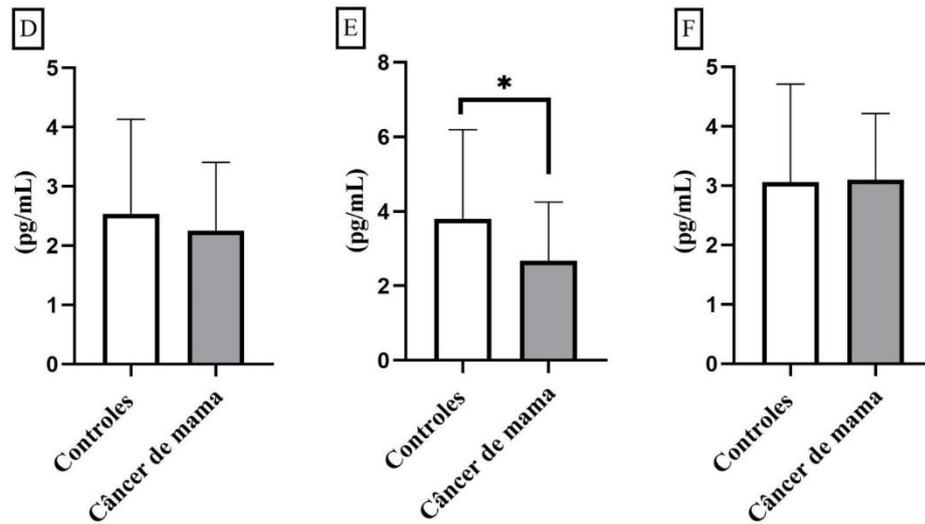


Figura 4: **A.** O nível de IL-2 no plasma do grupo CM mostrou-se diminuído (2,234 pg/mL; 1,055 a 0,2724 pg/mL, n=15) comparado com o grupo controle (3,106 pg/mL; 0,6822 a 0,1655 pg/mL, n=17). Valor de $p=0,0013$. **B.** O nível de IL-4 no plasma do grupo CM mostrou-se diminuído (3,562 pg/mL; 2,076 a 0,4641 pg/mL, n=20) comparado com o grupo controle (5,107 pg/mL; 3,081 a 0,7474 pg/mL, n=17). Valor de $p=0,0547$. **C.** O nível de IL-6 no plasma do grupo CM não apresentou diferença estatística (6,058 pg/mL; 1,977 a 0,4123 pg/mL, n=23) comparado com o grupo controle (5,780 pg/mL; 5,159 a 0,9266 pg/mL, n=31). Valor de $p=0,0939$. **D.** O nível de IL-10 no plasma do grupo CM não apresentou diferença estatística (2,253 pg/mL; 1,151 a 0,2302 pg/mL, n=25) comparado com o grupo controle (2,539 pg/mL; 1,597 a 0,2916 pg/mL, n=30). Valor de $p=0,4309$. **E.** O nível de TNF no plasma do grupo CM mostrou-se diminuído (2,686 pg/mL; 1,562 a 0,3063 pg/mL, n=26) comparado com o grupo controle (3,801 pg/mL; 2,397 a 0,4377 pg/mL, n=30). Valor de $p=0,0156$. **F.** O nível de IFN- γ no plasma do grupo CM não apresentou diferença estatisticamente significativa (3,100 pg/mL; 1,115 a 0,2230 pg/mL, n=25) comparado com o grupo controle (3,059 pg/mL; 1,652 a 0,3017 pg/mL, n=30). Valor de $p=0,8635$. Os dados foram apresentados como mediana e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança a 95%.

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo apontam o envolvimento do SP nas modulações celulares que ocorrem no CM, conseqüentemente os processos inflamatórios e imunes envolvidos neste sistema. Evidenciado pelo aumento a atividade do ATP extracelular e da hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em linfócitos do grupo CM. Ainda, foi evidenciado a diminuição de algumas interleucinas inflamatórias no grupo CM, dentre essas o TNF e a IL-2, as quais atuam na apoptose celular e também nas modulações celulares respectivamente, favorecendo a progressão tumoral.

Com a caracterização da amostra foi possível observar que as pacientes participantes do estudo tinham média de idade de $58,30 \pm 12,5$ anos, que coincide com o perfil de mulheres com CM no Brasil, com incidência predominante na faixa etária de 50 a 69 anos. Este dado reforça a importância do rastreamento preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) a partir 50 anos para todas as mulheres, de modo a garantir a detecção precoce da doença e aumento da sobrevivência (INCA, 2023).

No presente estudo, analisamos a quantificação sérica de ATP extracelular e comparamos a hidrólise dos nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e a atividade da ADA em linfócitos de pacientes com CM e de indivíduos controle. Também foram avaliados os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias em pacientes com CM e em indivíduos controle.

No que tange à quantificação de ATP extracelular, em nosso estudo está se mostrou aumentada no grupo CM, quando comparado com o grupo controle. Este resultado corrobora com estudos que trazem uma concentração anormalmente alta de ATP extracelular no microambiente tumoral, onde o mesmo desempenha um papel importante, pois é responsável por algumas funções biológicas em tumores, como estimular a proliferação, migração e invasão de células tumorais (ZHOU et al., 2016).

Ainda, vem ao encontro de outros estudos que abordam esta temática, relacionando o aumento dos níveis sistêmicos do ATP como fator pró-inflamatório e participante ativo da carcinogênese (JIANG et al., 2015; KEPP et al., 2021). Revela a dupla função do ATP no ambiente tumoral atuando tanto como ativador do sistema imune quanto na progressão tumoral (DRAGANOV et al., 2015; LACERDA; GONZAGA; MACIEL, 2021). Dessa forma, percebe-se que o crescimento tumoral depende dos elevados níveis de ATP, o qual desempenha ação pró tumoral (DRAGANOV et al., 2015).

No que concerne a hidrólise dos nucleotídeos pelas ectonucleotidasas (CD39 e CD73),

os resultados aqui apresentados mostram que a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP pela CD39 e a hidrólise de AMP pela CD73 é maior no grupo CM. No entanto, a atividade da ADA não apresentou diferença estatísticas entre os grupos. Esses resultados sugerem que paciente com CM tem uma maior atividade de CD39 e CD73, favorecendo um ambiente imunossupressor, pois alta hidrólise de ATP, ADP e AMP pode desencadear a formação de altas concentrações de Ado.

Corroborando com este achado Mânica et al (2019), avaliaram a hidrólise desses nucleotídeos em plaquetas, estando estas aumentadas em pacientes com melanoma, sugerindo possível mecanismo de imunossupressão, pois alta hidrólise de ATP poderia levar à formação de grandes quantidades de ado, desenvolvendo, portanto, imunossupressão. Outro estudo demonstrou aumento da atividade da CD73 em câncer colo retal e câncer de laringe, sugerindo hidrólise de AMP a Ado e diminuição da atividade de ADA em câncer colo retal, câncer de cavidade oral e câncer de laringe. Neste contexto, trazem que a alta atividade e expressão de CD73 em células cancerígenas têm sido associadas com baixa sobrevida global, presença de metástases e recorrência em vários tumores (MARAFON et al., 2022).

Gheler e colaboradores (2021) demonstraram que pacientes com CM apresentam altos níveis de hidrólise de ATP em comparação ao grupo controle, e que isso pode ser explicado uma vez que a hidrólise completa de ATP, formando Ado extracelular, limita a resposta imune. Em seu estudo, a hidrólise de ADP foi semelhante em ambos os grupos, porém observaram um aumento na hidrólise de AMP no grupo de pacientes com CM, vindo ao encontro do nosso estudo.

De maneira semelhante, alguns estudos analisaram a hidrólise de nucleotídeos em plaquetas de pacientes do sexo feminino com CM, e os resultados demonstraram que a hidrólise do ATP foi aumentada e a hidrólise do ADP foi reduzida na comparação com grupo controle. A hidrólise do AMP não apresentou alterações. (ARAÚJO et al, 2005). Em soro observaram que expressão e a atividade de CD73 em células cancerígenas ou células imunes supressoras e no sangue periférico são significativamente aumentadas em pacientes, representando uma potencial estratégia imunoterapêutica para melhorar as respostas mediadas por células T contra células tumorais (MORELLO et al., 2019).

Quanto à atividade da ADA, nossos resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa em linfócitos do grupo CM em relação ao grupo controle. Contraponto a este resultado, Aghaei e colaboradores (2005) avaliaram as atividades séricas totais de ADA em pacientes com CM e controles saudáveis, sendo observado que as atividades séricas totais de ADA em pacientes com CM foram significativamente maiores do que em

indivíduos saudáveis.

Diante disso, pode-se justificar conforme Allard e colaboradores (2017) que a Ado extracelular derivada de CD73 tem uma meia-vida muito curta, de alguns segundos, podendo ser catabolizada em inosina pela ADA ligada à membrana, recapturada por transportadores de nucleosídeos equilibrados e concentrados, ou ativando receptores purinérgicos (ALLARD et al., 2017).

Quanto às interleucinas inflamatórias, nossos resultados demonstraram que o TNF e as IL-2 e IL-4 estão diminuídos no grupo CM. Cruceriu e colaboradores (2020) trazem que o TNF pode apresentar duplo papel, dependendo do estágio do tumor. Além da função apoptótica, inibindo a progressão tumoral, este no microambiente tumoral pode desempenhar importante papel na progressão e evolução da doença, por meio de mecanismos como a promoção da inflamação.

Nesse viés, com relação ao TNF este estudo traz altas concentrações no soro de pacientes com CM invasivos em comparação com indivíduos saudáveis (CRUCERIU et al, 2020). Em outro estudo, o TNF por células tumorais foi significativamente aumentada em pacientes com carcinoma ductal invasivo com recidiva em comparação com aqueles com carcinoma ductal in situ. Investigações adicionais sugeriram que esse parâmetro poderia diferenciar pacientes com massas benignas daqueles com CM maligno (HAMED; ZAKHARY; MAXIMOUS, 2012). Ademais, em nosso estudo demonstrou a redução dos níveis dessa interleucina no grupo CM, o que pode ser justificado pelo grupo amostral, o qual é composto por mais de 50% de paciente com carcinoma invasivo não especificado, podendo esta ser um marcador de malignidade.

A IL-2 destaca-se por sua capacidade de modular as células Natural Killer (NK), nesse viés o tratamento com IL-2 foi relacionado com resultados favoráveis em vários tipos de câncer, tornando-se a primeira imunoterapia eficaz para o câncer humano (WIDOWATI et al, 2020). A IL-2 possui ação anti-tumoral, sendo estudada como método terapêutico em pacientes com melanoma, induzindo respostas benéficas duradouras, no entanto com alta toxicidade (BRIUKHOVETSKA et al, 2021).Tendo em vista estes achados a redução desta interleucina no grupo CM favoreceria a progressão tumoral, sendo este um dos resultados deste estudo.

Estudos demonstram que os macrófagos, que são as células de defesa mais abundantes no microambiente tumoral, quando polarizadas por IL-4 favorecem a migração e invasão de células no CM, ou seja, esta interleucina possui ação pró-tumoral (PEQUENO et al, 2019;

BRIUKHOVETSKA et al, 2021). Nesse sentido, o aumento dessa interleucina por consequência favorece a metástase, em contrapartida em nosso estudo foi observado uma redução dos níveis da IL-4 no grupo CM, este achado pode demonstrar que essa interleucina pode ser utilizada como um marcador de prognóstico de metástase, visto que neste grupo mais de 40% dos indivíduos não desenvolveram metástase à distância e em mais da metade não foi observado metástase de linfonodos.

Os achados deste estudo corroboram com a hipótese do envolvimento do SP e seus mecanismos pró- inflamatório no CM, podendo influenciar diretamente na carcinogênese, progressão tumoral e imunossupressão. Essa desregulação celular dos nucleotídeos e nucleosídeos evidenciada no sangue periférico do grupo CM, são dados relevantes para futuras pesquisas que busquem novos métodos terapêuticos, bem como diagnóstico para o CM envolvendo as interleucinas inflamatórias aqui estudadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, mostramos pela primeira vez alterações significativas de toda via purinérgica envolvendo a hidrólise de ATP em Ado em linfócitos de indivíduos com CM. A desregulação dos nucleotídeos e nucleosídeos demonstradas neste estudo, além do aumento de ATP extracelular sugerem o envolvimento do SP nas modulações celulares ocorridas no CM, comcomitantemente as alterações inflamatórias e imunossupressoras envolvendo este sistema.

Portanto, os achados do nosso estudo sugerem um processo inflamatório devido ao aumento de ATP extracelular no grupo CM, pois sabe-se que o ATP extracelular possui função pró-inflamatória, participa diretamente das modulações purinérgica e na carcinogênese. Além disso, nossos resultados favorecem um ambiente imunossupressor, pois a alta hidrólise de ATP, ADP e AMP no grupo CM, podem desencadear a formação de altas concentrações de Ado, sinalizando piores desfechos na progressão do câncer e reforçando o papel do SP no CM. Quanto às interleucinas inflamatórias, destaca-se a diminuição do TNF e da IL-2 no grupo CM, favorecendo a apoptose celular e ação antitumoral, através das modulações celulares das células NT causadas pela IL-2 contribuindo para progressão tumoral.

No entanto, alguns vieses do estudo podem ter ocorrido devido algumas limitações encontradas durante o desenvolvimento da pesquisa, como a particularidade do trabalho ser com seres humanos, tamanho e quantidade amostral pequena para algumas análises. Contudo ainda, nossos achados tornam-se importante para futuras pesquisas que buscam novas possibilidades terapêuticas e diagnósticas para o manejo de pacientes com CM.

REFERÊNCIAS

AGHAEI, Mahmood et al. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: The assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. **Clinical Biochemistry**, v.38, n. 10, p.887-891, out. 2005. Disponível: Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: The assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities - ScienceDirect. Acesso em 05 jun. 2022.

AKRAM, Muhammad et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, Paquistão, jul./set. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28969709/>. Acesso em 18 maio. 2022.

ARAÚJO, Julia Beatrice de et al. Targeting the purinergic pathway in breast cancer and its therapeutic applications. **Purinergic Signalling**, v. 17, p. 179-200, fev. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11302-020-09760-9>. Acesso em 15 fev. 2022.

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%3DIihub>. Acesso em 15 fev. 2023.

ALLARD, Bertrand et al. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. **International Journal of Cancer**, Canadá, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23982901/#:~:text=Notably%2C%20the%20pro%2Dangiogenic%20effects,suppressed%20tumor%20angiogenesis%20in%20vivo>. Acesso em 15 jun. 2022.

ANASTASIADI, Zoi et al. Breast cancer in young women: an overview. **Review article**, v.69, p. 313-317, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13304-017-0424-1>. Acesso em 20 mai. 2023.

AZEVEDO, Daniela Batista et al. Perfil das mulheres com câncer de mama. **Rev Enferm UFPE**. v.11, n.6, p. 2264-72, 2017. Disponível em: <https://periodicos.ufpe.br/revistas/revistaenfermagem/article/view/23386>. Acesso em 16 fev. 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BARZAMANA, Khadijeh et al. Câncer de mama: Biologia, biomarcadores e tratamentos. **Imunofarmacologia Internacional**, abr.2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>. Acesso em 15 jun. 2022.

BOISON, Detlev. Adenosine Augmentation Therapy. **National Center for Biotechnology**

Information, 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98157/pdf/Bookshelf_NBK98157.pdf. Acesso em 15 set. 2022.

BRADEN, Amy.M et al. Breast Cancer Biomarkers: Risk Assessment, Diagnosis, Prognosis, Prediction of Treatment Efficacy and Toxicity, and Recurrence. **Bentham Science Publishers**, v.20, p.4878-4898, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24283956/>. Acesso em 01 jun. 2023.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional de Câncer. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em 21 jun de 2022.

BRIUKHOVETSKA, Daria et al. Interleukins in cancer: from biology to therapy. **Nature reviews cancer**, v.21, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41568-021-00363-z>. Acesso em 10 jun. 2023.

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 jun. 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 jun. 2022.

BURNSTOCK, Geoffrey. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 371, n. 1700, ago. 2016. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2015.0422>. Acesso em 04 jun. 2023.

CRUCERIU, Daniel et al. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. **Cellular Oncology**, v. 43,p. 1-18, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13402-019-00489-1>. Acesso em 10 jun.2023.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/onc2016206>. Acesso em 05 jun. 2023.

DIEZMOS, Erica et al. Purinergic signaling in gut inflammation: the role of connexins and <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2016.00311/full>. Acesso em 18 jan. 2023.

DRAGANOV, D. et al. Modulation of P2X4/P2X7/ Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP

via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Scientific reports*. v. 5, n. 5, nov. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4639773/>. Acesso em 03 fev. 2023.

FERRO, F. et al. Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. v. 98, fev. 2020, p. 129-138. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952118301691?via%3Dihub#fig0005>. Acesso em 02 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.

FRANCIOSI, Maria Luiza Mukai et al. Inflammatory profile in cervical cancer: influence of purinergic signaling and possible therapeutic targets. **Inflammation Research**, v.71, p.555-564, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00011-022-01560-8>. Acesso em 10 mai. 2023.

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.

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. 2022.

GESSI, Stefania. et al. Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 17, p. 5895-5901, set. 2004. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/10/17/5895/185338/Elevated-Expression-of-A3-Adenosine-Receptors-in>. Acesso em 10 jan. 2023.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Methods of enzymatic analysis. **Weinheim: Verlag Chemie**, 1984.

GRATAL, Paula et al. Purinergic System Signaling in Metainflammation-Associated Osteoarthritis. **Review Frontiers in Medicine**. Ago/2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.00506/full>. Acesso em 20 nov. 2022.

HAMED, A; ZAKHARY, M.M; MAXIMOUS, D.W. Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: Basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. **J.**

Cancer Res Clin Oncol, v. 138, p. 999–1009, 2012.

HECHT, Fabio et al. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. **Tumor Biol**, jan. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26815507/> . Acesso em 20 jan. 2022.

HOLDER, Patrick, G et al. Engineering interferons and interleukins for cancer immunotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.182, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X22000023?via%3Dihub>. Acesso em 10 fev. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 18 mar. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/dados-e-numeros/incidencia>. Acesso em: 18 jan. 2023.

JIANG, J. X.; RIQUELME, M. A.; ZHOU, J. Z. ATP, a double-edged sword in cancer. *Oncoscience*. v. 2, n. 8, p. 673-674 ,ago. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26425653/>. Acesso em: 03 fev. 2023.

KEPP, Oliver et al. ATP and cancer immunosurveillance. **The EMBO Journal**. Fev/2021. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/emboj.2021108130>. Acesso em: 15 jan. 2023.

KUNZLI, Beat. M, et al. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 2, p. 231-241, jun. 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11302-011-9228-9>. Acesso em 10 fev. 2023.

WIDOWATI, Whayu, et a. Effect of interleukins (IL-2, IL-15, IL-18) on receptors activation and cytotoxic activity of natural killer cells in breast cancer cel. **Afr Saúde Sci**. v. 20, p. 822-832. Jun. 2020. Disponível em: Efeito de interleucinas (IL-2, IL-15, IL-18) sobre a ativação de receptores e atividade citotóxica de células natural killer em células de câncer de mama - PMC (nih.gov). Acesso em 10 jul. 2023.

LACERDA, A. P.; GONZAGA, H. S.; MACIEL, S. F. V. O. Câncer de mama e sistema purinérgico. In: CARDOSO, A. M.; MANFREDI, L.; MACIEL, S. F. V. O (org.). Sinalização Purinérgica: Implicações fisiopatológicas. Chapecó: UFFS, 2021. p. 138-155. Disponível em:

<https://www.uffs.edu.br/institucional/reitoria/editora-uffs/repositorio-de-e-books/sinalizacao-puriner-gica-implicacoes-fisiopatologicas-pdf>. Acesso em 27 jan. 2023.

LEAL, Daniela. B et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1721, p.9-15, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416504002417?via%3Dihub>. Acesso em 15 fev. 2023.

LEVE, Simone de et al. Targeting the Immunomodulatory CD73/Adenosine System to Improve the Therapeutic Gain of Radiotherapy. **Front. Immunol**, França, abr./ 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00698>. Acesso em 18 mai. 2022.

LISON, Carmen Griñan, et al. Antioxidants for the Treatment of Breast Cancer: Are We There Yet?. **Review antioxidants**, Suíça, v. 10, n. 0, jan./2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33572626/#:~:text=Traditionally%20antioxidants%20have%20been%20extensively,the%20treatment%20of%20breast%20cancer>. Acesso em 25 out. 2021.

MANICA, Aline et al. High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. *Jornal Cell Biochem*, p. 1-9, 2019. Disponível em: High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients - PubMed (nih.gov). Acesso em 25 jul. 2023.

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.

MARAFON, Filomena et al.,. Deregulation of puriner-gic ectoenzyme activity in head and neck cancer promotes immunosuppression. **Molecular Biology Reports**, v. 49, p. 7687–7695. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-022-07586-9>. Acesso em 15 mai. 2023.

MIOT, A. Hélio. Análise de correlação em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, Out. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvb/a/YwjG3GsXpBFRZLQhFQG45Rb/?lang=pt>. Acesso em 25 jan. 2023.

MISA, Iwona Bednarz et al. Interleukins 4 and 13 and Their Receptors Are Differently Expressed in Gastrointestinal Tract Cancers, Depending on the Anatomical Site and Disease Advancement, and Improve Colon Cancer Cell Viability and Motility. **Cancers**, v. 12, 2021.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1463>. Acesso em 12. Fev. 2023.

MORELLO, Silvana et al. Enzyme activity of circulating CD73 in human serum. **Methods in Enzymology**, v. 629, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687919302253>. Acesso em 10 mai. 2023.

PASQUINI, Silvia et al. Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. **Review Molecular Sciences**. Itália, jul. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/14/7685>. Acesso em out. 2022.

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**, v. 26, n. 4, p.181-5, 2016. DOI: 10.5327/Z201600040008RBM. Acesso em: 16 fev, 2023.

PEQUENO, André. C et al. Macrófagos Estimulados por IL-4/IL-13 Aumentam a Invasão do Câncer de Mama Via Regulação Rho-GTPase da Sinalização Sinérgica VEGF/CCL-18. **Frete. Oncol**, v.9, 2019. Disponível em: Fronteiras | Macrófagos Estimulados por IL-4/IL-13 Aumentam a Invasão do Câncer de Mama Via Regulação Rho-GTPase da Sinalização Sinérgica VEGF/CCL-18 (frontiersin.org). Acesso em 25 jul. 2023.

PFAFFENZELLER, Marta Schmidt; FRANCIOSI, Maria Luiza Mukai; CARDOSO, Andréia Machado. Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical Cancer. **Purinergic Signalling**, v. 16, P.123-135, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11302-020-09693-3>. Acesso em 10 jun. 2023.

QIU, Ving et al. P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin. **Oncology reports**, China, out./2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29115551/>. Acesso em 25 mai. 2022.

RALEVIC, Vera; DUNN, William R. Purinergic transmission in blood vessels. **Autonomic Neuroscience**, v. 191, p. 48–66, set. 2015. Disponível em: [https://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566-0702\(15\)00043-0/fulltext](https://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566-0702(15)00043-0/fulltext). Acesso em 10 jun. 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.

SAUDADE, A.; TOMÁS, A.R.; FONSECA, R. Determinação da Amplificação do HER2 por Hibridação in situ de Fluorescência (FISH). *Acta Medica Portuguesa*, v. 18, p. 417-422, 2005.

SOLEIMANI, Anvar et al. CD73; a key ectonucleotidase in the development of breast cancer: Recent advances and perspectives. **Cell Physiol**, jan./2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.28187>. Acesso em 25 out. 2021.

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 nov. 2021.

SUNG, H., FERLAY, J., S et al. **Estatísticas Globais do Câncer 2020**: Estimativas Globais de Incidência e mortalidade em todo o mundo para 36 cânceres em 185 Países. **Globocan**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>. Acesso em 25 nov. 2021.

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.

TSANG, Julia Y.S et al. Molecular Classification of Breast Cancer. **Review article**, v.27, n. 1. jan./2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045583/> . Acesso em 10 jun. 2022.

WAN, Han. et al. Important roles of P2Y receptors in the ammation and cancer of digestive system. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 28736-28747, 2016. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/7518/text/>. Acesso em 14 fev. 2023.

YU, Jiengang et al. A preliminary study of the role of extracellular -5'- nucleotidase in breast cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. **In Vitro Cell.Dev.Biol**, set./2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27670764/>. Acesso em 10 jun. 2022.

ŸUKASIEWICZ, Sergiusz et al. Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies An Updated Review. **Review cancers**, v.13, n.0, jul./ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>. Acesso em 25 out. 2021.

ZHOU, Y.Coral et al. Mechanisms of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Motors. **Annu Rev Biophys**, jul. 2016. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biophys-051013-022819>. Acesso em 25 out. 2022.

ZUBAIR, M.; WANG, S.; ALI, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 632079, 26 fev. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.632079/full>. Acesso em 10 jun. 2023.

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