

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

SIMONE LUCIANA TRIQUEZ

**EXPRESSÃO DOS GENES *CD39*, *CD73* E *P2X7* EM PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA LUMINAL**

CHAPECÓ
2025

SIMONE LUCIANA TRIQUEZ

**EXPRESSÃO DOS GENES CD39, CD73 E P2X7 DE PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA LUMINAL**

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.

Orientadora: Prof. Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

CHAPECÓ

2025

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Simone Luciana Triquez

Expressão dos genes CD39, CD73 e P2X7 de pacientes com câncer de mama luminal / Simone Luciana Triquez . -- 2025.

47 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, 2025.

I. Maciel, Sarah Franco Vieira de Oliveira, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

SIMONE LUCIANA TRIQUEZ

**EXPRESSÃO DOS GENES *CD39*, *CD73* E *P2X7* DE PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA LUMINAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso
Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade
Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para
obtenção do título de Mestre.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 07/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

(Assinado digitalmente em 12/02/2025 12:54)

SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA MACIEL

COORDENADOR DE CURSO

PPGCB - CH (10.41.13.10.05)

Matricula: ###122#6

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

(Assinado digitalmente em 12/02/2025 10:53)

DEBORA TAVARES DE RESENDE E SILVA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

ACAD - CH (10.41.13)

Matricula: ###135#9

Prof.^a Dr.^a Debora Tavares de Resende e Silva - UFFS
Avaliadora

(Assinado digitalmente em 12/02/2025 10:18)

ALINE MÂNICA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.519-##

Prof.^a Dr.^a Aline Mânica – Unochapecó
Avaliadora

Dedico este trabalho aos mestres, a resiliência,
a coragem e a capacidade de entender os
mistérios dessa jornada. Que este trabalho seja
reflexo de gratidão e esperança no poder do
conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos mestres que proporcionaram momentos de conhecimento e vivências incríveis. Agradeço em especial a minha orientadora Sarah, que acreditou nesse projeto e se manteve acreditando que seria possível.

Aos meus pais, que sabem o quanto essa etapa foi importante para mim e para minha evolução.

Agradeço a espiritualidade que me trouxe reflexões e aprendizados inimagináveis durante esse tempo e para o tempo. Me fez compreender que nada nessa vida é por acaso e que os acasos são lindos e perfeitos. “Só por hoje eu confio, só por hoje eu sou grata, só por hoje eu sou calmo, só por hoje eu sou honesto, só por hoje sou bondoso” (Mikao Usui).

“Ouça os conselhos e esteja pronto para aprender; assim, um dia você será sábio”. Provérbios 19-20.

RESUMO

O câncer de mama (CM) é considerado uma doença multifatorial que pode surgir de alterações no reparo do Ácido Desoxirribonucleico (DNA). O processo de formação tumoral no CM envolve a ativação do sistema purinérgico (SP) pela sinalização dos receptores purinérgicos e através da presença de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Este estudo teve como objetivo caracterizar a expressão de genes *CD39*, *CD73* e *P2X7* no tecido neoplásico e em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes com CM e de indivíduos controle saudáveis. Trata-se de estudo transversal de análise quantitativa tipo caso e controle incluindo 32 participantes. As análises da expressão gênica dos genes *CD39*, *CD73* e *P2X7* em tumores de mama e em (PBMCs) de pacientes com CM mostraram que a expressão do gene *P2X7* é significativamente maior ($p=0,0032$) em relação à expressão do gene *CD39* em amostras de PBMCs de pacientes com CM. A expressão do gene *CD39* nas amostras de tumores de mama, PBMCs de pacientes com CM e controles obteve significância entre os grupos ($p=0,006$). A expressão de *CD39* foi 1,71 vezes maior nos tumores em relação aos PBMCs de pacientes com CM ($p=0,02$), e foi 0,11 vezes menor nos PBMCs de pacientes com CM em relação aos controles ($p=0,01$). Os dados mostraram uma modulação distinta na expressão dos genes *P2X7*, *CD73* e *CD39* entre as amostras de tumor de mama, PBMCs de pacientes com CM e controles. Os resultados apresentados reforçam a importância da investigação de biomarcadores e mecanismos moleculares envolvidos no CM. A modulação desses genes pode auxiliar na identificação de novos alvos terapêuticos ou biomarcadores para monitoramento da progressão tumoral no CM.

Palavras-chave: Purinas; Neoplasia de Mama; Expressão Gênica.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is considered a multifactorial disease that may arise from alterations in deoxyribonucleic acid (DNA) repair. The tumor formation process in BC involves the activation of the purinergic system (PS) by purinergic receptor signaling and through the presence of extracellular nucleotides and nucleosides. This study aimed to characterize the expression of CD39, CD73 and P2X7 genes in neoplastic tissue and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with BC and healthy control individuals. This is a cross-sectional study with quantitative case-control analysis including 32 participants. The analyses of gene expression of CD39, CD73 and P2X7 genes in breast tumors and in PBMCs of patients with BC showed that the expression of the P2X7 gene is significantly higher ($p=0.0032$) in relation to the expression of the CD39 gene in PBMC samples of patients with BC. The expression of the CD39 gene in breast tumor samples, PBMCs from patients with BC and controls was significant between groups ($p=0.006$). The expression of CD39 was 1.71 times higher in tumors compared to PBMCs from patients with BC ($p=0.02$) and was 0.11 times lower in PBMCs from patients with BC compared to controls ($p=0.01$). The data showed a distinct modulation in the expression of the P2X7, CD73 and CD39 genes between breast tumor samples, PBMCs from patients with BC and controls. The results presented reinforce the importance of investigating biomarkers and molecular mechanisms involved in BC. The modulation of these genes may help in the identification of new therapeutic targets or biomarkers for monitoring tumor progression in BC.

Keywords: Purines; Breast Neoplasia; Gene Expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Expressão relativa dos genes P2X7, CD39 e CD73 nas amostras de tumores de mama, PBMCs de pacientes com câncer de mama e controles.....	34
Figura 2 - Correlação da expressão dos genes nas amostras tumorais.	36
Figura 3 - Correlação da expressão dos genes nas amostras de controles.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características das amostras dos pacientes com CM.	33
Tabela 2 - Dados de mediana e IC 95% para a expressão de cada um dos genes (P2X7, CD39 e CD73) comparativamente nos três grupos (tumores de mama, PBMCs de pacientes CM e controles).	35
Tabela 3 - Análises de associação entre os genes P2X7, CD39 e CD73 em amostras de tumores de mama, PBMCs de pacientes com CM e controles.	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Sequências dos primers para as reações de RT-qPCR, e padronização da reação RT-qPCR.....	31
Quadro 2 - Padronização da reação RT-qPCR.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdCC	Carcinoma adenoide cístico
ADA	Adenosina Deaminase
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BL1	Câncer de Mama Triplo Negativo Basal 1
BL2	Câncer de Mama Triplo Negativo Basal 2
BRCA1	Câncer de Mama 1 e 2
BI-RADS	Breast Imaging Reporting and Data System
c-MYC	Oncogene proteína
CCM	Cirurgia Conservadora de Mama
CD39	Ecto nucleosídeo trifosfato Difosfohidrolase 1
CD73	Ecto-5'-nucleotidase
cDH1	Gene Codificador de Proteína
CL	Claudin-low
CM	Câncer de Mama
CSCs	Células Tronco Cancerígenas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição Epitelial-mesenquimal
esiRNA	endoribonuclease-prepared siRN
GRB7	Proteína ligada ao Receptor do Fator de Crescimento 7
GST	Genes Supressores de Tumor
HER	Fator de Crescimento Epidérmico Humano
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
IHQ	Imuno-histoquímica
IM	Câncer de Mama Triplo Negativo imunomodulador
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LAR	Câncer de Mama Triplo Negativo Receptor Androgênico Luminal
MSL	Câncer de Mama Triplo Negativo Semelhante à Haste

PBMCs	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PI3K	Fosfoinositol-3-cinase
PTEN	Fosfatase Homóloga à Tensina
RE	Receptores de Estrogênio
RH	Receptor Hormonal
RNA	Ácido Ribonucleico
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RP	Receptor de Progesterona
RT-qPCR	PCR Quantitativo em Tempo Real com Expressão Reversa
SL	Tipo Haste Mesenquimal
SP	Sistema Purinérgico
STK11	Serina/treonina quinase 11
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo De Consentimento Livre e Esclarecido
TME	Microambiente Tumoral
TNBC	Câncer de Mama Triplo-negativo
TNM	Estado Nodal e Metástase
TP53	Proteína Supressora de Tumor 53
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UNS	Câncer de Mama Triplo Negativo Não Especificado
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	CÂNCER DE MAMA	18
2.1.1	Tipos de câncer de mama, considerando perfil imuno-histoquímico (IHQ) ..	18
2.1.2	Diagnóstico do câncer de mama.....	21
2.1.3	Tipos de tratamento	22
2.2	SISTEMA PURINÉRGICO E O CÂNCER DE MAMA	25
3	METODOLOGIA	28
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	28
3.2	POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM.....	28
3.3	COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	28
3.4	EXPRESSÃO GÊNICA	30
3.5	ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS.....	32
4	RESULTADOS.....	33
5	DISCUSSÃO	39
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

O tipo mais comum de câncer de mama (CM) é o carcinoma ductal invasivo, que se origina nas células dos ductos mamários e tem potencial de invadir os tecidos adjacentes. Alguns mecanismos são considerados como auxiliares na progressão da doença, como: capacidade infiltrativa, divisão celular ilimitada, aumentando a probabilidade de metástase., Além disso, é um processo multifatorial e em alguns casos associados a fatores genéticos (Łukasiewicz et al., 2021; Sung et al., 2021). O CM é a doença neoplásica com maior índice de mortalidade no Brasil e no mundo, por ser a mais incidente e devido ao diagnóstico tardio. No Brasil, 16,3% do total de mulheres com CM morreram em 2022, as regiões mais afetadas foram Sudeste e Centro-Oeste, seguidos de Nordeste, Sul e Norte. A faixa etária mais acometida é de mulheres acima de 50 anos (Tan et al., 2020; INCA, 2022).

Os CM são quase todos adenocarcinomas, e são normalmente caracterizados com base nos receptores expressos pelas células neoplásicas, sendo eles receptores hormonais (receptor de estrogênio, RE; receptor de progesterona, RP) e de fatores de crescimento epidérmico (receptor tipo 2 ou receptor HER2). Com isso, um CM pode ser positivo ou negativo para estes receptores, o que vai direcionar a forma de tratamento e influenciar a sobrevida dos pacientes (INCA, 2022).

Em quase 80% dos casos o CM começa no epitélio do ducto mamário, dependendo da extensão e proliferação celular esse tumor poderá tomar caminhos diferentes, formando metástases (Sung et al., 2021; De Araújo et al., 2021). Essa desregulação inicia-se no ciclo celular, com mudanças na informação genética como mutações e instabilidade genômica mudanças nas características celulares, perda e descontrole das respostas imunes de proliferação e crescimento, resultando em aparecimento de aglomerados de células tumorais, culminando por fim em nódulos mamários, que por vezes são indolores ; de Araújo et al., 2021).

Embora o câncer de mama seja uma doença multifatorial, ele está associado a uma série de alterações celulares e moleculares, incluindo o comprometimento dos mecanismos de reparo do DNA, o aumento na expressão de proto-oncogenes, instabilidade cromossômica, reativação da telomerase e modificações epigenéticas. Essas mudanças colaboram para a iniciação, progressão e manutenção do fenótipo maligno, promovendo a proliferação celular descontrolada e a resistência a terapias (De Oliveira et al., 2016).

O sistema imunológico é responsável por identificar e eliminar células anormais ou infectadas em nosso corpo. No caso do câncer, as células cancerígenas podem adquirir mecanismos de evasão imunológica, tornando-se menos visíveis para o sistema imune.

Além disso, o próprio tumor pode secretar substâncias que suprimem a resposta imunológica, criando um ambiente favorável ao seu crescimento. Baseado nessa afirmação, o microambiente tumoral (TME) tem envolvimento na progressão de células tumorais, e novas evidências destacam o envolvimento do sistema imune nessas alterações. Acredita-se que a Adenosina Trifosfato (ATP) tenha papel fundamental, funcionando como molécula sinalizadora em combinação com receptores purinérgicos na superfície celular (Zhu et al., 2021).

Sistema Purinérgico (SP) é um sistema de sinalização celular que envolve a liberação e ação de purinas, como ATP, Adenosina Difosfato (ADP) e adenosina (Ado), nas células. No caso do CM, pesquisas sugerem que a expressão de receptores purinérgicos, como *P2X7*, está aumentada nas células neoplásicas. A estimulação desses receptores tem sido associada ao crescimento e proliferação das células de CM, além de contribuir para a resistência a tratamentos convencionais (Di Virgilio, 2012).

Além disso, a conversão do ATP em Ado é um mecanismo importante no controle do equilíbrio entre os nucleotídeos extracelulares, que são pró-inflamatórios, e a Ado, que possui ação anti-inflamatória e imunossupressora. O aumento dos níveis de Ado pode limitar a resposta inflamatória e promover a resolução dos processos inflamatórios. Contudo, a ação exacerbada da Ado pode resultar em dificuldades no tratamento do CM (Di Virgilio, 2012; Burnstock, 2017).

O ATP é convertido em ADP e em Adenosina Monofosfato (AMP) por enzimas chamadas ectonucleotidases. Destacamos que essa conversão ocorre através da ectoenzima ectonucleosídeo difosfohidrolase 1 (*CD39*) e pela ecto-5'-nucleotidase (*CD73*). Ou seja, a *CD39* converte o ATP em ADP e este em AMP, enquanto a *CD73* converte AMP em Ado. O ADP e o AMP também podem ser liberados diretamente pelas células. Esses nucleotídeos podem ter efeitos diversos no organismo, incluindo a modulação da resposta imune, a regulação do fluxo sanguíneo, a indução da morte celular programada (apoptose) e a modulação da neurotransmissão (Burnstock, 2012; de Araújo et al., 2021; Zimmermann, 2021).

Investigar o sistema purinérgico no câncer de mama pode revelar alvos terapêuticos promissores, como inibidores de *P2X7* ou bloqueadores de *CD73*, que poderiam melhorar a eficácia das imunoterapias e reduzir a progressão da doença. Além disso, entender como essas vias estão moduladas entre diferentes subtipos de câncer de mama pode levar ao desenvolvimento de terapias personalizadas, otimizando o tratamento e o prognóstico dos pacientes. Os resultados deste estudo serão detalhados nos capítulos seguintes, fornecendo uma análise integrada dos mecanismos purinérgicos no CM e suas implicações terapêuticas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão dos genes *CD39*, *CD73* e *P2X7* em tumores de mama e em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com CM diagnosticadas na região oeste de Santa Catarina.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a expressão de genes *CD39*, *CD73* e *P2X7* em tumores de mama e PBMCs de pacientes com CM, comparando com indivíduos controle saudáveis;
- Comparar a expressão dos genes *CD39*, *CD73* e *P2X7* entre tumores de mama e PBMCs de pacientes com CM;
- Correlacionar a expressão dos genes *CD39*, *CD73* e *P2X7* com parâmetros clínicos e histopatológicos das amostras de pacientes com CM;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O CM é a 5ª causa principal de morte entre as mulheres em todo o mundo, representa 11,7% de todos os tipos de câncer, além disso sua incidência aumentou significativamente em 2020, ultrapassando a de câncer de pulmão. Estima-se um aumento de mais de 2,3 milhões de novos casos para os próximos anos (Sung et al., 2021).

No Brasil, o CM é o mais incidente entre as mulheres, excluindo-se os tumores de pele não melanoma. Estima-se que, entre 2023 e 2025, cerca de 73.610 novos casos de CM surjam a cada ano, o que representa uma taxa ajustada de 66,54 casos por 100.000 mulheres. Esse índice varia regionalmente, sendo mais alto nas regiões Sudeste e Sul, onde as taxas são de 84,46 e 71,44 por 100.000 mulheres, respectivamente. No Brasil, 13,6% do total de mulheres com CM morreram em 2022, as regiões mais afetadas foram Sudeste, Centro-Oeste, seguidos de Nordeste, Sul e Norte (INCA,2024). De maneira geral, a maior parte dos diagnósticos de CM está relacionado ao padrão de envelhecimento da população e características associadas ao comportamento e estilo de vida modernos (INCA, 2022).

A etiologia do CM apresenta um complexo contexto multifatorial envolvendo fatores ambientais e genéticos, obesidade, idade avançada, menarca precoce, consumo de álcool e de tabaco (De Araújo et al., 2021b). Dentre os subtipos de CM em relação à expressão gênica e no fenótipo da neoplasia (considerando expressão dos receptores já citados), pode-se caracterizar quatro subtipos principais: luminal A, luminal B, superexpressão do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2+) e TNBC (Barnard; Boeke; Tamimi, 2015). Alguns sinais e sintomas relacionados com o CM são nódulos palpáveis, mudança do tamanho da mama, da cor do mamilo/aréola. Raramente dor e descarga papilar estão relacionados com o CM, e a forma mais comum de diagnóstico é com o exame de mamografia de *screening* (Robbins & Cotran; 2010; Sarhangi et al., 2022).

2.1.1 Tipos de câncer de mama, considerando perfil imuno-histoquímico (IHQ)

A maioria dos CM são adenocarcinomas, normalmente se refere a uma proliferação neoplásica de células epiteliais, observa-se a infiltração da membrana basal e se desenvolve em meio ao estroma (Robbins & Cotran; 2010; Łukasiewicz et al., 2021). Com base na expressão dos genes podemos dividir o CM em luminais (A ou B, que expressam receptores hormonais), HER2 superexpresso (HER2+) e o TNBC ou *basal-like* (Łukasiewicz et al., 2021). Os CM

luminais compreendem quase 70% dos casos na população ocidental, são cânceres com positividade para expressão de receptores hormonais (RH+).

Os luminais A apresentam RE e RP, além de uma taxa menor de proliferação celular, que é avaliada pelo fator de índice mitótico Ki-67, que neste tipo de neoplasia é caracterizado como menor que 14%. Já o CM luminal B possui as mesmas características do luminal A, podendo ter RP negativo e/ou HER2 positivo, porém com maior proliferação celular, o que configura um Ki-67 maior que 14% (Łukasiewicz et al., 2021); 2021; Sarhangi et al., 2022).

O CM HER2+ representa de 10% a 15% dos casos. Este subtipo expressa principalmente genes e proteínas relacionados à proliferação (como HER2 e proterina 7 ligada ao receptor do fator de crescimento (GRB7)), em vez de agrupamentos de genes e proteínas luminais e basais. Os CM HER2+ crescem mais rapidamente em relação aos CM luminais e, antes da introdução das terapias direcionadas para HER2, estes subtipos tinham o pior prognóstico (Roberts et al., 2013). Já o TNBC é um grupo heterogêneo de neoplasias malignas mamárias caracterizadas por serem RE-negativo, RP-negativo e HER2-negativo. Representam aproximadamente 20% de todos os CM (Santonja et al., 2018a). O TNBC é mais comum em mulheres com menos de 40 anos de idade. A maioria (aproximadamente 80%) dos CM causados por variantes germinativas patogênicas no gene do câncer de mama (*BRCA1*) são TNBC, e 11–16% de todos esses contêm mutações nos genes *BRCA1* ou breast cancer gene tipo 2 (*BRCA2*) (Roberts et al., 2013; Łukasiewicz et al., 2021).

O TNBC tende a ser biologicamente agressivo e está frequentemente associado a um mau prognóstico (Tan et al., 2020). A histologia mais comum deste tipo de câncer é o carcinoma ductal invasivo, mas também pode se apresentar como carcinoma medular com infiltração linfocítica acentuada; carcinoma metaplásico, que pode mostrar diferenciação de células escamosas ou fusiformes; e tipos raros e especializados de câncer, por exemplo, carcinoma adenoide cístico (AdCC) (Santonja et al., 2018b; Łukasiewicz et al., 2021). O termo basal e TNBC são usados indistintamente. No entanto, nem todo TNBC é basal. No perfil de expressão gênica, o TNBC pode ser subdividido em 7 subtipos: tipo basal (*BL1 e BL2*), mesenquimal, tipo mesenquimal semelhante a haste (MSL), imunomodulador (IM) e receptor androgênico luminal (LAR), e a não especificada (UNS). No entanto, a relevância clínica da subtipagem permanece obscura e são necessários mais estudos para elucidar o seu impacto nas decisões de tratamento nos casos de TNBC (Hennessy et al., 2009; Santonja et al., 2018a; Łukasiewicz et al., 2021).

2.1.2 Fatores de risco

O sexo feminino é um dos principais fatores associados ao aumento do risco de CM, principalmente devido à maior estimulação hormonal. Ao contrário dos homens, que apresentam níveis insignificantes de estrogênio, as mulheres possuem células mamárias muito sensíveis aos hormônios (especialmente estrogênio e progesterona) e os possíveis desequilíbrios. Menos de 1% de todos os casos de CM ocorrem em homens, e normalmente é diagnosticado numa fase mais avançada do que nas mulheres. Fatores importantes que aumentam o risco de CM em homens são: idade avançada, variantes patogênicas nos genes com mutações *BRCA1/BRCA2*, níveis elevados de estrogênio, Síndrome de *Klinefelter*, histórico familiar de CM e exposição à radiação na parede torácica na infância ou adolescência (Łukasiewicz et al., 2021; Kashyap et al., 2022).

Estudos epidemiológicos associaram vários fatores ao risco de desenvolvimento ou progressão do CM: idade avançada, primeiro parto e menopausa tardios, bem como menarca precoce, devido à exposição crônica das células do parênquima mamário ao estrogênio (Kashyap et al., 2022).

A gravidez precoce e a amamentação prolongada têm um efeito protetor contra o desenvolvimento do CM, tanto do tipo RE+ quanto RP-. Por outro lado, uma dieta desequilibrada, especialmente aquela rica em gordura animal e não vegetariana, aumenta o risco de CM (Michaels; Worthington; Rusiecki, 2023). Além disso, uma baixa atividade física também foi associada a um maior risco de CM (Barnard; Boeke; Tamimi, 2015b; Łukasiewicz et al., 2021).

A incidência de CM aumenta com a idade, sendo a maioria dos casos diagnosticados em mulheres com mais de 50 anos. Isso pode ser devido a fatores como o envelhecimento das células mamárias, hormônios e exposição a fatores de risco ao longo da vida (Slepicka; Cyrill; dos Santos, 2019). Uma possível explicação para essa observação é a diferença na biologia do CM em diferentes idades. O TNBC é conhecido por ter uma taxa de crescimento mais rápida e ser mais comum em mulheres jovens. Por outro lado, o subtipo luminal A é geralmente associado a um crescimento mais lento e é mais comum em mulheres mais velhas (Łukasiewicz et al., 2021).

Os genes mais comumente associados ao risco aumentado de CM são o *BRCA1* (mutações neste gene estão presentes em cerca de 45% a 90% das mulheres com histórico familiar de câncer de mama) e o *BRCA2* (mutações neste gene estão presentes em cerca de 40% a 85% das mulheres com histórico familiar de CM) (Kuchenbaecker et al., 2017).

Outros genes de alta penetrância associados ao CM são Fosfatase Homóloga à Tensina (*PTEN*), Proteína Supressora de Tumor (*TP53*), Serina/treonina quinase 11 (*STK11*) e Gene Codificador de Proteína Caderina 1 (*CDH1*), podendo apresentar variantes germinativas patogênicas em casos familiares de CM. Embora esses genes também estejam associados ao risco aumentado de CM, eles geralmente têm uma penetrância menor em comparação com *BRCA1* e *BRCA2*. Isso significa que as mutações nesses genes podem aumentar o risco de CM, mas nem todas as pessoas com mutações nesses genes desenvolverão a doença (Łukasiewicz et al., 2021).

O gene *TP53* está envolvido na regulação do ciclo celular e na reparação do DNA danificado. Mutações germinativas neste gene estão associadas a um distúrbio genético raro chamado síndrome de *Li-Fraumeni*, que aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo CM e câncer de ovário. Já o gene *CDH1*, que codifica a proteína E-caderina, desempenha um papel importante na adesão celular e na manutenção da integridade tecidual. Mutações neste gene estão associadas ao risco aumentado de CM difuso hereditário e câncer gástrico difuso hereditário. O gene *PTEN* é outro gene supressor de tumor (*GST*) que regula a divisão celular e a morte celular programada. Mutações neste gene estão associadas a uma condição genética chamada Síndrome de *Cowden*, que aumenta o risco de CM, câncer de tireoide e outros tipos de câncer. O gene *STK11*, também conhecido como gene supressor de tumor 11 fenótipo *Peutz-Jeghers*, está envolvido na regulação do crescimento celular e na supressão tumoral. Mutações neste gene estão associadas à Síndrome de *Peutz-Jeghers*, que aumenta o risco de desenvolvimento de tumores benignos e malignos, incluindo CM e câncer de ovário (Barnard; Boeke; Tamimi, 2015; Łukasiewicz et al., 2021; Michaels; Worthington; Rusiecki, 2023).

Portanto, mulheres com histórico familiar de CM, especialmente aquelas portadoras de variantes patogênicas nos genes acima descritos, devem ser acompanhadas por profissionais de saúde e realizar exames de triagem regulares para detectar precocemente o CM, além de medidas profiláticas como cirurgias redutoras de risco. Além disso, adotar um estilo de vida saudável, como manter um peso adequado, fazer exercícios físicos regularmente e evitar o consumo excessivo de álcool, também podem reduzir o risco de desenvolver a doença (Łukasiewicz et al., 2021).

2.1.2 Diagnóstico do câncer de mama

A mamografia é um método de triagem amplamente utilizado para detectar o CM.

Uma das vantagens da mamografia é que ela não requer nenhum agente com contraste, o que significa que é um procedimento relativamente simples e de baixo custo. Além disso, a mamografia é eficaz na detecção de tumores tanto em mulheres com mamas densas quanto em mulheres com mamas não densas. No entanto, em algumas situações, a mamografia pode não ser suficiente para detectar todos os casos de CM, especialmente em mulheres de alto risco, sendo necessário outros exames de imagem, como a ultrassonografia mamária e a ressonância nuclear magnética (RNM) (Sung et al., 2021).

A RNM é um exame de imagem mais sensível que a mamografia, especialmente na detecção do carcinoma ductal invasivo. Uma das principais vantagens da RNM em relação à mamografia é que ela não é afetada pela densidade da mama. Além disso, é particularmente útil na detecção de cânceres primários ocultos, ou seja, neoplasias malignas de mama manifestadas primariamente com metástases. No entanto, é importante ressaltar que a RNM não substitui a mamografia como método de triagem padrão para o CM (Łukasiewicz et al., 2021; Michaels; Worthington; Rusiecki, 2023).

Quando uma mulher apresenta anormalidades suspeitas de malignidade no exame mamográfico (pontuação radiográfica 4 e 5 do Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS[®])), é recomendada a realização de biópsia da mama para confirmar o diagnóstico. Os biomarcadores diagnósticos seriam particularmente úteis em casos em que os resultados da biópsia são indeterminados. No entanto, atualmente não há biomarcadores específicos recomendados para uso diagnóstico de rotina, embora pesquisas estejam em andamento para desenvolvê-los. O termo BI-RADS refere-se a um sistema padronizado de classificação e relatório utilizado em exames de imagem mamária, como mamografias, ultrassons e ressonâncias magnéticas. A categoria de classificação inicia em 0 até 6 (Sarhangi et al., 2022; Michaels; Worthington; Rusiecki, 2023).

2.1.3 Tipos de tratamento

A abordagem individualizada ao CM envolve a avaliação de vários fatores, como características específicas da neoplasia, principalmente relacionadas a IHQ, fatores de risco e preferências do paciente, a fim de desenvolver um plano de tratamento personalizado. Isso pode incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo, terapia hormonal e imunoterapia, entre outros (Burstein et al., 2021; Łukasiewicz et al., 2021).

Avanços na área da genômica também têm desempenhado um papel importante na personalização do tratamento do CM.

Testes genômicos podem ser realizados para identificar características moleculares específicas do tumor, como avaliar a atividade de certos genes, o que pode ajudar a determinar o risco de recorrência e a resposta potencial a diferentes tratamentos (Burstein et al., 2021).

Além disso, a resposta ao tratamento neoadjuvante, que é realizado antes da cirurgia para reduzir o tamanho do tumor, também pode fornecer informações valiosas sobre a eficácia do tratamento sistêmico. Isso permite ajustes no plano de tratamento, se necessário, para otimizar os resultados. No entanto, é importante ressaltar que a abordagem individualizada não significa que cada paciente receberá um tratamento completamente único. As diretrizes de tratamento ainda desempenham um papel importante e são baseadas em evidências científicas que demonstraram benefícios para a maioria dos pacientes em determinadas situações clínicas (Łukasiewicz et al., 2021).

Nessa fase, são utilizadas terapias sistêmicas como quimioterapia, terapia hormonal e terapia-alvo, que visam controlar o crescimento e disseminação do tumor. Além disso, há também a opção de realizar uma cirurgia paliativa para aliviar sintomas, como dor ou desconforto. A radioterapia também pode ser utilizada para aliviar sintomas locais, como dor óssea. O tratamento do CM também pode incluir terapias complementares, como a terapia de suporte, que auxilia no manejo dos efeitos colaterais do tratamento, e a terapia psicológica, que auxilia no bem-estar emocional e na qualidade de vida do paciente (Łukasiewicz et al., 2021; Traves; Cokenakes, 2021; Ben-drór; Shalamov; Sonnenblick, 2022).

Quando se trata de cirurgia, pode-se utilizar tanto a cirurgia conservadora de mama (CCM), como mastectomia, dependendo do tamanho da neoplasia, do tamanho da mama, da biologia tumoral, se foi realizado tratamento neoadjuvante ou não; além dos fatores de risco e de prognóstico relacionados com cada paciente (Łukasiewicz et al., 2021; Ben-drór; Shalamov; Sonnenblick, 2022). A CCM tem como objetivo preservar ao máximo a mama e seu formato natural. Durante o procedimento, apenas a área afetada pelo câncer é removida, juntamente com uma margem de tecido saudável ao redor. Isso é seguido pela reconstrução e remodelagem da mama para restaurar sua aparência estética, e obrigatoriamente realizada a radioterapia adjuvante para complementar o tratamento locorregional da doença (Traves; Cokenakes, 2021^a; Bursteine et al., 2021).

A quimioterapia pode ser realizada tanto na forma de adjuvância e neoadjuvância. As drogas são administradas em ciclos, geralmente a cada 2-3 semanas, para permitir a recuperação do organismo entre as doses (Burstein et al., 2021).

O número total de ciclos varia de acordo com o tipo e estágio do câncer, mas geralmente é recomendado um mínimo de 4-6 ciclos.

A escolha do esquema de quimioterapia depende do tipo molecular do tumor, bem como de outros fatores individuais do paciente, como idade, estado de saúde e preferências pessoais (Burstein et al., 2021; Łukasiewicz et al., 2021).

A quimioterapia adjuvante é utilizada após a cirurgia para tumores localizados, com o objetivo de destruir células cancerosas residuais e reduzir o risco de recidiva. Nesse caso, o tratamento é geralmente iniciado dentro de 4-8 semanas após a cirurgia e dura de 3 a 6 meses (Burstein et al., 2021). No caso do CM localmente avançado, a quimioterapia neoadjuvante é utilizada como parte do tratamento sistêmico para controlar o crescimento do tumor e aliviar os sintomas. Os esquemas de quimioterapia podem variar de acordo com a progressão da doença e a resposta do paciente (Ben-dror; Shalamov; Sonnenblick, 2022).

Podemos destacar também o uso da radioterapia no tratamento do CM. A radioterapia adjuvante é realizada após a cirurgia para destruir qualquer célula cancerosa residual que possa ter sido abandonada. (Trayes; Cokenakes, 2021; Ben-dror; Shalamov; Sonnenblick, 2022;). Existem diferentes técnicas de radioterapia mamária, como a radioterapia de feixe externo, onde feixes de radiação são direcionados para a mama de fora do corpo, e a braquiterapia, onde uma fonte de radiação é colocada diretamente na mama. A escolha da técnica depende de vários fatores, incluindo o estágio do câncer, tamanho do tumor, localização e preferência do paciente (Burstein et al., 2021).

A radioterapia da parede torácica é realizada após a remoção completa da mama (mastectomia), visando a prevenção de recidiva local. Já o *breast boost* é uma técnica que consiste na aplicação de uma dose adicional de radiação de alta dose no local onde o tumor foi removido, a fim de reduzir ainda mais a chance de recidiva (Ben-dror; Shalamov; Sonnenblick, 2022).

A terapia hormonal pode ser usada tanto como terapia neoadjuvante ou adjuvante em CM luminal. Esses avanços proporcionaram uma melhora significativa para pacientes com CM positivo para RH, tanto na interrupção do crescimento tumoral quanto na redução dos riscos de recorrência da doença.

Muito provável esse processo ocorra devido à redução sistêmica de níveis de estrogênio por diferentes mecanismos, ou seja, em pacientes na pós-menopausa através de inibidores da aromatase e agonistas do hormônio liberador do hormônio luteinizante (Aromasin, Arimidex e Latrozone), principais medicamentos para essa linha (Trayes; Cokenakes, 2021).

A terapia alvo ou terapia biológica, pode ser utilizada em todas as fases da terapia mamária, tanto antes da cirurgia como depois. A terapia biológica pode ser administrada antes da cirurgia como terapia neoadjuvante, com o objetivo de reduzir o tamanho do tumor e aumentar as chances de sucesso da cirurgia. Esta abordagem pode permitir uma cirurgia menos invasiva e preservação da mama em alguns casos. Após a cirurgia, a terapia biológica pode ser administrada como terapia adjuvante para reduzir o risco de recorrência do câncer (Łukasiewicz et al., 2021; Trayes; Cokenakes, 2021).

2.2 SISTEMA PURINÉRGICO E O CÂNCER DE MAMA

O SP é um sistema de sinalização celular que utiliza principalmente ATP como molécula sinalizadora. Essas moléculas são liberadas pelas células e podem atuar como neurotransmissores ou moduladores da função celular. Geoffrey Burnstock foi o primeiro a descrever esse sistema na década de 70. Ele observou que o ATP poderia ser liberado por células nervosas e musculares em resposta a estímulos variados, e que essa liberação de ATP poderia desencadear uma série de respostas celulares (Di Virgilio, 2012). O SP foi descrito como uma associação de sinalizadores com receptores P1 de Ado acoplados à proteína G (A1, A2A, A2B e A3), e receptores P2 de nucleotídeos, subdivididos em P2X e P2Y. Os receptores P2X são compostos por 7 tipos de receptores de canais catiônicos (P2X1-7), e os receptores P2Y1, 2, 4, 6, 11 e 14 são acoplados à proteína G (Di Virgilio, 2012; Zimmermann, 2021).

O ATP é convertido em ADP e AMP por enzimas chamadas ectonucleotidases. Destacamos que essa conversão ocorre através das ectoenzimas ectonucleosídeo difosfohidrolase 1 (*CD39*) e pela ecto-5'-nucleotidase (*CD73*). Ou seja, a *CD39* converte o ATP em ADP e este por sua vez em AMP, enquanto a *CD73* converte AMP em Ado. O ADP e o AMP também podem ser liberados diretamente pelas células. Esses nucleotídeos podem ter efeitos diversos no organismo, incluindo a modulação da resposta imune, a regulação do fluxo sanguíneo, a indução da morte celular programada (apoptose) e a modulação da neurotransmissão (Burnstock, 2012; De Araújo et al., 2021; Zimmermann, 2021).

A enzima adenosina deaminase (ADA) atua quebrando a Ado e convertendo-a em inosina, um nucleosídeo. Sua principal função é regular os níveis de Ado no organismo e

impedir uma superestimulação do sistema purinérgico, que poderia levar a efeitos negativos, como inflamação e danos celulares. A ADA está presente em diferentes tecidos e células, como linfócitos, células gliais, células do sistema nervoso central e células do intestino (De Araújo et al., 2021).

A Ado também tem um papel importante no sistema purinérgico. Ela é um modulador endógeno do sistema nervoso, agindo como um neurotransmissor inibitório. A Ado é liberada pelas células e se liga aos receptores P1 encontrados em diferentes tecidos e órgãos. A ativação desses receptores pode ter efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e imunossupressores (Di Virgilio, 2012; De Araújo et al., 2021).

O SP tem papel importante no processo de formação tumoral no CM, a ativação dos receptores purinérgicos e a presença de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem ter um papel significativo na progressão tumoral. A Ado, por exemplo, exerce efeitos promotores do crescimento do CM, estimulando a proliferação celular, a angiogênese e a resistência à apoptose. No entanto, as enzimas ectonucleotidases CD39 e CD73 têm um papel regulador importante nesse contexto. Essas enzimas são responsáveis pela quebra dos nucleotídeos extracelulares em Ado. A atividade dessas enzimas resulta em uma redução dos níveis de nucleotídeos pró-inflamatórios e promotores do crescimento tumoral, e um aumento nos níveis de Ado (De Araújo et al., 2021).

A Ado gerada pela ação das enzimas CD39 e CD73 atua através da ligação aos receptores P1, desencadeando respostas celulares anti-inflamatórias e antitumorais. A Ado pode inibir a proliferação celular, promover a apoptose e modular a resposta imune, limitando a progressão tumoral. Portanto, a ação da Ado na modulação tumoral pode ser complexa e depender de vários fatores, como o tipo de tumor, o estágio do câncer, a presença de inflamação e a resposta imune do indivíduo. Essa complexidade torna a Ado um alvo potencial para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais, visando regular sua ação pró-tumoral e aumentar sua ação antitumoral (Oliveira, 2013; Burnstock, 2012; De Araújo et al., 2021; Zimmermann, 2021).

A Ado desempenha um papel crucial como imunossupressor no TME, contribuindo significativamente para a evasão imunológica das células cancerígenas. O aumento do ATP extracelular, frequentemente associado à morte celular e inflamação, ativa as enzimas CD39 e CD73, que catalisam a conversão sequencial do ATP em Ado.

Esta, se liga a receptores específicos, como A2A e A2B, presentes em células imunológicas, promovendo sinais que suprimem respostas efetoras, incluindo a proliferação e atividade citotóxica de linfócitos T e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Zhi et al., 2007; Hausler et al., 2011; Baghbani et al., 2022a).

Além disso, a presença elevada de Ado no TME está associada à redução da eficácia de terapias convencionais, como quimioterapia, radioterapia, terapias-alvo e imunoterapias, dificultando a resposta imune antitumoral (Baghbani et al., 2022b).

Assim, estratégias que visem inibir a atividade de CD39, CD73 ou bloquear os receptores de Ado emergem como potenciais abordagens terapêuticas para reverter a imunossupressão e melhorar os resultados clínicos em pacientes oncológicos (Baghbani et al., 2021a).

Em resumo, a interação dos nucleotídeos e nucleosídeo extracelulares com os receptores purinérgicos P1 e P2 pode influenciar a progressão do CM. A presença das enzimas ectonucleotidases CD39 e CD73, responsáveis pela formação de Ado, pode modular essa interação, exercendo efeitos antitumorais e anti-inflamatórios. No entanto, mais estudos são necessários para entender completamente a complexidade dessa interação e explorar seu potencial terapêutico no CM (De Araújo et al., 2021; Zhu et al., 2021).

Além disso, dentre os receptores, a família de receptores P2 é a mais expressiva nos tumores. Os receptores P2X têm como principal mecanismo de transdução de sinal a concentração iônica intracelular, mas, além disso, foi relatado que o P2X7 interage diretamente com pelo menos 11 proteínas intracelulares diferentes, entre as quais proteínas de choque térmico, β -actina e fosfatidilinositol 4-quinase. O P2X7 destaca-se por favorecer a sobrevivência e proliferação tumoral. Em tecidos mamários saudáveis esse receptor não é expresso, porém quando há o tumor ele é muito presente (Di Virgilio, 2012; Zhu et al., 2021).

Estudos sugerem que a superestimulação do receptor P2X7 pode levar à ativação de vias apoptóticas nas células tumorais, levando à sua morte. Isso pode ser mediado pela liberação de fatores como o ATP, que se acumula no TME devido à alta taxa de metabolismo das células tumorais. Por outro lado, a ativação do receptor P2X7, que ocorre em níveis mais baixos de estímulo, pode promover o crescimento do tumor. Isso pode estar relacionado a efeitos pró-inflamatórios da ativação do receptor, levando à proliferação celular e à angiogênese (Zhu et al., 2021). Portanto, o receptor P2X7 é considerado um biomarcador de prognóstico de câncer devido sua alta expressão em diversos tumores, inclusive no CM. Não é comum a expressão no P2X7 em tecidos mamários normais, logo, sua presença tem um papel fundamental na identificação precoce do CM (De Araújo et al., 2021; Di Virgilio, 2012; Zhu et al., 2021).

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo transversal, de análise quantitativa, do tipo caso e controle, com um total de 32 participantes organizadas em dois grupos: grupo controle (n= 16) e grupo CM (n= 16).

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

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 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.

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 submetidas a procedimentos cirúrgicos para retirada do tumor ou a terapia neoadjuvante (quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia, terapia de precisão), foram excluídas mulheres com histórico prévio de qualquer neoplasia maligna.

3.3 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas do grupo CM foram realizadas no dia do procedimento cirúrgico para retirada do tumor, 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 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Conforme concordância com os objetivos da pesquisa, no pré ou no ato operatório foram coletadas amostras sanguíneas e de tecidos das pacientes com CM, todas as coletas foram realizadas por profissionais qualificados e autorizados.

O material tumoral foi coletado durante a cirurgia de remoção do tumor, materiais que, normalmente, seriam descartados após análise patológica.

Mantidos no ácido ribonucleico (RNA) later (solução de estabilização e armazenamento) e encaminhados até o laboratório para manutenção em freezer a -80 °C.

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. As informações clinicopatológicas obtidas através da consulta aos prontuários das pacientes com CM abrangeram a idade, subtipo histológico e molecular do tumor, tamanho do tumor, grau do tumor, metástases em linfonodos, metástases a distância, receptores imunohistoquímicos tumorais, história familiar de câncer, comorbidades (hipertensão, síndrome metabólica, diabetes, entre outras).

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 PBMCs 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 PBMCs, 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. O pellet de células foi suspenso em microtubo em volume adequado de solução RNA later, para inativação de RNAses e manutenção da integridade do RNA. 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 EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão dos genes alvo (CD39, CD73, P2X7) e de referência (actina B - ACTB) nos tumores, bem como em PBMCs, foi avaliada pela técnica de RT-qPCR. A extração de RNA das amostras foi realizada utilizando o reagente Trizol. Foi adicionado 500 µl de Trizol no pellet de células ou tecido tumoral, seguido de homogeneização da amostra, e a separação das fases ocorreu de acordo com as especificações do fabricante, com ajustes de protocolo.

O RNA isolado das amostras foi tratado com a enzima DNase (a fim de evitar a contaminação com DNA). As concentrações e pureza dos RNAs foram determinadas utilizando o espectrofotômetro "Nanodrop®" (Thermo Scientific). A retrotranscrição de até 2 µg de RNA para síntese de cDNA foi realizada com o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems), conforme especificações do fabricante. Após, foram preparadas soluções de uso do cDNA a 20 ng/µl. Os RNAs extraídos foram posteriormente estocados em freezer a -80 °C, e os cDNAs em freezer a -20 °C

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento QIAquant 96 5 plex (Qiagen), com o protocolo "Sybr Green" (Applied Biosystems). A análise da expressão gênica por Quantificação Relativa (DDCt) foi realizada pelo método do DDCt. Curvas-padrão para cada um dos genes foram elaboradas para a análise das eficiências de reação (E), necessárias ao método do DDCt. Em 10 µl de volume de reação, foram adicionados 2 µl de cDNA molde (40 ng), 2 pmol dos primers forward e reverse e 5 µl de "Sybr Green" (Applied Biosystems).

Para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo em relação ao de referência, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$D Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência}$$

$$DD Ct = D Ct - D Ct \text{ amostra calibradora}$$

As sequências dos iniciadores para os genes alvos foram obtidas conforme as especificações necessárias para análises de RT-qPCR e contemplando as regiões de junções de éxons, com auxílio dos softwares PRIMER-3¹ e Oligo Analyzer² (Quadro 1).

O Quadro 2 apresenta o protocolo das reações de PCR. Após a análise das temperaturas de dissociação dos genes, foi comparada a expressão dos genes alvos entre as amostras dos pacientes com e sem CM.

Quadro 1-Sequências dos primers para as reações de RT-qPCR.

Gene	Foward	Reverse
<i>ACTB</i>	<i>GATGCAGAAGGAGATCACTGC</i>	<i>AGTACTTGCGCTCAGGAGGA</i>
<i>E-NTPDase1 (CD39)</i>	<i>TGCCCCTTATGGAAGATATAAAGGA</i>	<i>TAACTGCTGCACCACTCCTG</i>
<i>P2X7</i>	<i>GATCATCACTGGGCAGGAGGAAGG</i>	<i>AAGACACCGTTGAAGGCACACTGG</i>
<i>CD73</i>	<i>GACATGACTCTGGTGACCA</i>	<i>GACCTTCAACTGCTGGAT</i>

Fonte: Exxtend Oligos³, 2022

Quadro 2 - Padronização da reação RT-qPCR.

Reagentes	Volume na reação (µl)	Concentração total na reação
Água ultra-pura	2,75	
Iniciador <i>forward</i> e <i>reverse</i> (10 pmol/µL)	0,25	10,0 uM
<i>SYBR green PCR Master Mix</i>	5,0	
cDNA (20,0 ng/µL)	2,0	40,0 ng
Programa de PCR	10 min a 50 °C 10 min a 95 °C 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C (45 X) Curva de dissociação (pré-programada)	

Fonte: SyBr Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies)
Legenda: pmol, pico molar; µl, microlitro; ng, nanogramas, T, volume total; °C, graus Célsius.

¹Disponível em: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

²Disponível em: <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>

³Disponível em: <https://www.exxtend.com.br/>

3.5 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0. As amostras foram em triplicata. Os *outliers* foram previamente removidos de acordo com o software utilizado e a análise da distribuição dos dados foi realizada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. A distribuição dos dados não seguiu a curva gaussiana, portanto, testes não paramétricos foram aplicados. O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar os dados entre dois grupos (CM e controles), e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar a expressão gênica entre os três grupos (tumores, CM e controles). Em relação às correlações, foram utilizados os testes de Correlação de Pearson e Correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram apresentados como mediana, intervalo de confiança de 95% e tamanho da amostra (n).

4 RESULTADOS

A Tabela 1 se refere a caracterização das amostras de pacientes com CM. Observa-se que algumas informações acerca do perfil tumoral e demais achados histopatológicos não foram descritas devido à ausência de anotações em prontuário. A média de idade das pacientes com CM (n=15) foi de $54 \pm 13,56$ anos, e a média de idade do grupo controle (n=12) foi de $73 \pm 14,3$ anos, não havendo diferença significativa da idade entre os grupos ($p = 0,62$).

Tabela 1- Características das amostras dos pacientes com CM.

Características Clínicas	Pacientes	%
Idade média \pm desvio padrão da idade	$54 \pm 13,56$ anos	
Tipo histológico do tumor [n (%)]:		
Carcinoma ductal invasivo	9	60%
Carcinoma invasivo não especificado	0	0%
Carcinoma mucinoso	1	7%
Sem informação no prontuário	5	33%
Grau histológico [n (%)]:		
Grau 1	1	7%
Grau 2	7	47%
Grau 3	2	13%
Sem informação no prontuário	5	33%
Imuno-histoquímica RE e/ou RP [n (%)]:		
Negativo	1	7%
Positivo	8	53%
Sem informação no prontuário	6	40%
HER2 [n (%)]:		
Negativo	8	53%
Positivo	1	7%
Sem informação no prontuário	6	40%
Subtipo molecular [n (%)]:		
Luminal A	7	47%
Luminal B	4	27%
Sem informação no prontuário	4	27%

Fonte: o autor, 2025.

Nota: Dados apresentados de forma numérica e percentual.

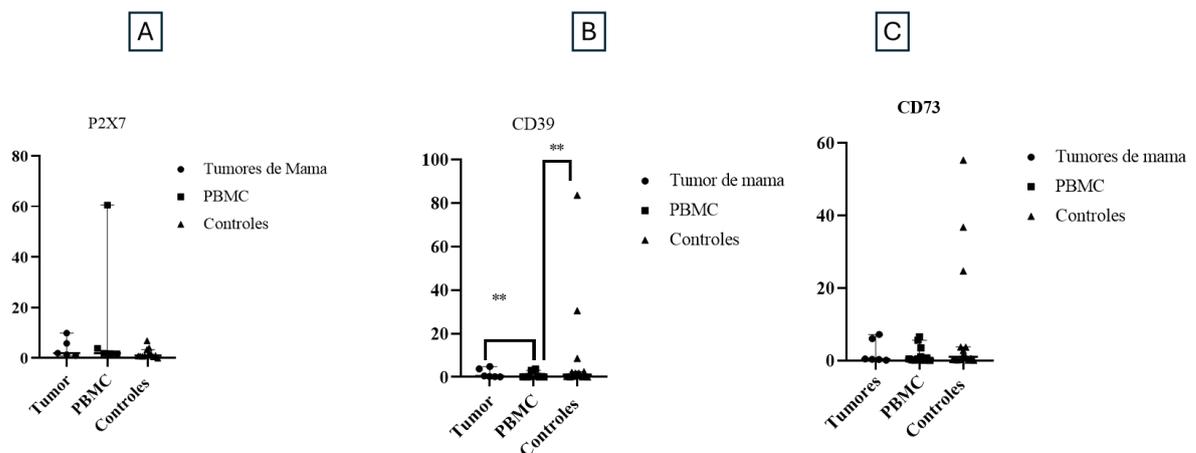
A Figura 1 e a Tabela 2 apresentam os dados da expressão de cada um dos genes avaliados (*P2X7*, *CD39* e *CD73*) comparativamente nos três grupos (tumores de mama, PBMCs de pacientes com CM e PBMCs do grupo controle). A Figura 1A mostra que não houve diferenças estatisticamente significativas na expressão do gene *P2X7* entre as amostras de tumores de mama, PBMCs de pacientes com CM e controles ($p = 0,13$). A ausência de diferença

na expressão do gene *P2X7* entre os três grupos sugere que não há uma regulação diferencial marcante associada ao estado de saúde ou doença nos tipos de amostras avaliadas.

A Figura 1B mostra que a expressão relativa do gene *CD39* nas amostras de tumores de mama, PBMCs de pacientes com CM e controles (n=27) variou significativamente entre os grupos (p= 0,006). A expressão de *CD39* foi 1,71 vezes maior nos tumores em relação aos PBMCs de pacientes com CM (p=0,02), e foi 0,11 vezes menor nos PBMCs de pacientes com CM em relação aos controles (p=0,01) (Tabela 4).

A Figura 1C mostra que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *CD73* (p= 0,40) entre as amostras de tumores de mama, PBMCs de pacientes com CM e controles. A ausência de diferença significativa na expressão do gene *CD73* entre os três grupos sugere que a expressão desse gene é relativamente estável e uniforme em diferentes estados de saúde e doença dos pacientes analisados.

Figura 1 - Expressão relativa dos genes *P2X7*, *CD39* e *CD73* nas amostras de tumores de mama, PBMCs de pacientes com câncer de mama e controles (n=22).



Fonte: o autor, 2025.

Figura 1: Teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram apresentados como mediana e IC 95%. **A:** Expressão relativa do gene *P2X7*. Não houve diferença na expressão do gene *P2X7* (p= 0,13) nas amostras de tumores (n=5), PBMCs de pacientes (n= 5) e de controles (n= 12). Na análise de múltiplas comparações as diferenças de expressão também não foram significativas (Tumor vs. PBMC, p= 0,99; Tumor vs. Controle, p= 0,44, PBMC vs. Controle, p= 0,24). **B:** Expressão relativa do gene *CD39*. Houve diferença na expressão do gene *CD39* (p= 0,006) nas amostras de tumores (n= 6), PBMCs (n= 8) e controles (n= 16). Na análise de múltiplas comparações também houve diferenças de expressão significativas (Tumor vs. PBMC, p= 0,02; Tumor vs. Controle, p= 0,99, PBMC vs. Controle, p= 0,01). **C:** Expressão relativa do gene *CD73*. Não houve diferença na expressão do gene *CD73* (n=26) nas amostras de tumores, PBMCs e controles (p= 0,40). Na análise de múltiplas comparações as diferenças de expressão também não foram significativas (Tumor vs. PBMC, p= 0,64; Tumor vs. Controle, p= 0,99, PBMC vs. Controle, p= 0,82). *p< 0,05, **p< 0,01.

Tabela 2 - Dados de mediana e IC 95% para a expressão de cada um dos genes (P2X7, CD39 e CD73) comparativamente nos três grupos (tumores de mama, PBMCs de pacientes CM e controles).

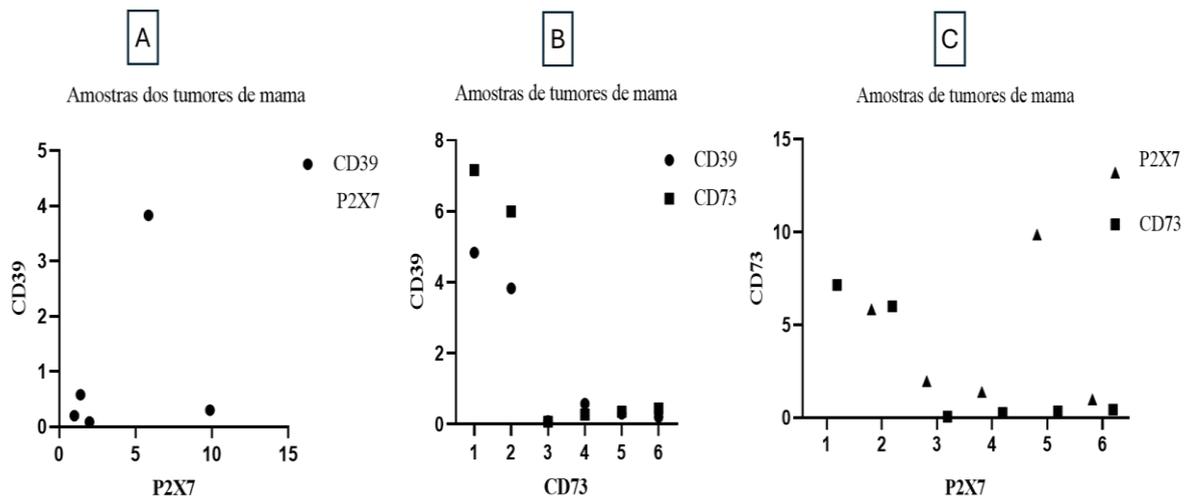
P2X7 (n= 22)		
Genes	Mediana	IC 95%
Tumor de mama	4,01	[0,99 - 9,87]
PBMCs CM	2,29	[1,69 - 3,80]
Controle	1,44	[0,52 - 3,38]
CD73 (n= 27)		
Genes	Mediana	IC 95%
Tumor de mama	2,38	[0,07 - 7,16]
PBMCs CM	0,37	[0,00 - 1,02]
Controle	1,20	[0,18 - 2,72]
CD39 (n= 26)		
Genes	Mediana	IC 95%
Tumor de mama	1,64	[0,09 - 4,84]
PBMCs CM	0,09	[0,00 - 0,25]
Controle	0,96	[0,15 - 1,88]

Fonte: o autor, 2025.

Nota: Dados representados por mediana e IC (Intervalo de Confiança de 95%) após análise estatística pelo teste de Kruskal- Wallis.

A Figura 2 mostra a correlação da expressão dos genes *P2X7*, *CD39* e *CD73* nas amostras tumorais. Não houve correlação da expressão entre os genes (A) *CD39* e *P2X7* ($r=0,3$; $p=0,68$), (B) *CD39* e *CD73* ($r=0,3$; $p=0,10$) e (C) *P2X7* e *CD73* ($r=-0,50$; $p=0,99$).

Figura 2 - Correlação da expressão dos genes nas amostras tumorais.

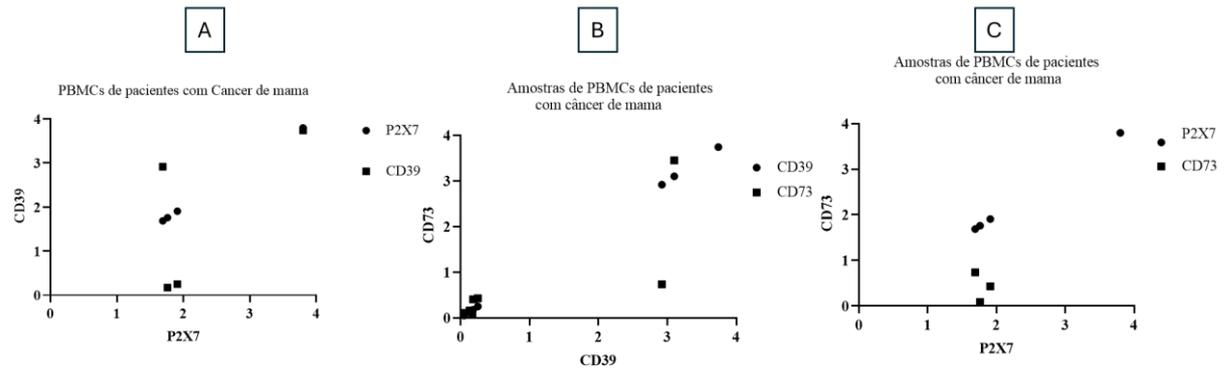


Fonte: o autor, 2025.

Figura 2: Teste de correlação de Spearman. Os dados foram apresentados como mediana e IC 95%. **A:** Não houve correlação entre a expressão dos genes *CD39* ($n=5$) e *P2X7* ($n=6$; $p=0,68$). **B:** Não houve correlação entre a expressão dos genes *CD39* ($n=6$) e *CD73* ($n=6$; $p=0,10$). **C:** Não houve correlação entre a expressão dos genes *P2X7* ($n=5$) e *CD73* ($n=6$; $p=0,95$).

A Figura 3 mostra a correlação da expressão dos genes *P2X7*, *CD39* e *CD73* nas amostras de PBMCs em pacientes com CM. Não houve correlação entre a expressão dos genes (A) *CD39* e *P2X7* ($r=0,40$; $p=0,75$). Houve correlação positiva entre a expressão dos genes (B) *CD39* e *CD73* ($r=0,89$; $p=0,01$). Não houve correlação entre a expressão dos genes (C) *P2X7* e *CD73* ($r=0,10$; $p=0,95$).

Figura 3 - Correlação da expressão dos genes nas amostras de PBMCs de pacientes com CM.

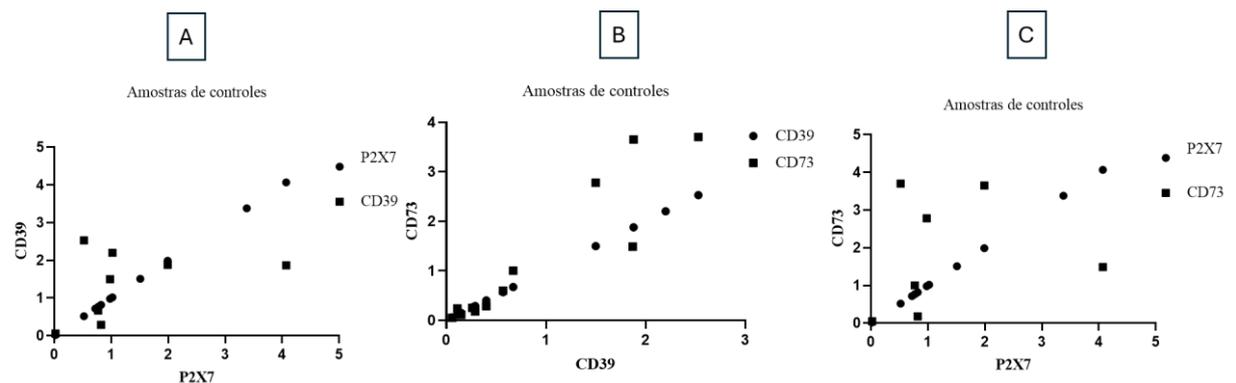


Fonte: o autor, 2025.

Figura 3: Teste de correlação de Spearman. Os dados foram apresentados como mediana e IC 95%. **A:** Não houve correlação entre a expressão dos genes *CD39* (n=8) e *P2X7* (n=4; $p=0,75$). **B:** Houve correlação positiva entre a expressão dos genes *CD39* (n=8) e *CD73* (n=8; $p=0,01$). **C:** Não houve correlação entre a expressão dos genes *P2X7* (n=5) e *CD73* (n=6; $p=0,95$).

A Figura 4 mostra a correlação da expressão dos genes *P2X7*, *CD39* e *CD73* nas amostras de controles. Não houve correlação entre a expressão dos genes (A) *CD39* e *P2X7* ($r=0,38$; $p=0,35$). Houve correlação positiva entre a expressão dos genes (B) *CD39* e *CD73* ($r=0,95$; $p=0,00$). Não houve correlação entre a expressão dos genes (C) *P2X7* e *CD73* ($r=0,32$; $p=0,49$).

Figura 3 - Correlação da expressão dos genes nas amostras de controles.



Fonte: o autor, 2025.

Figura 4: Teste de correlação de Spearman. Os dados foram apresentados como mediana e IC 95%. **A:** Não houve correlação entre a expressão dos genes *CD39* (n=13) e *P2X7* (n=11; $p=0,35$). **B:** Houve correlação positiva entre a expressão dos genes *CD39* (n=13) e *CD73* (n=12; $p=0,00$). **C:** Não houve correlação entre a expressão dos genes *P2X7* (n=11) e *CD73* (n=12; $p=0,49$).

A tabela 3 analisa a associação entre os genes *P2X7*, *CD39* e *CD73* nos grupos de tumores de mama, PBMCs de pacientes com CM e controles.

Tabela 3 - Análises de associação entre os genes *P2X7*, *CD39* e *CD73* em amostras de tumores de mama, PBMCs de pacientes com CM e controles.

		P2X7	CD73	CD39
Tumores de mama vs	n	22	26	27
PBMCs pacientes	FC	0,29	1,41	1,71
	p	0,99	0,64	0,02
PBMCs pacientes vs	n	22	26	27
PBMCs controles	FC	7,37	0,19	0,11
	p	0,24	0,82	0,01

Fonte: o autor, 2025.

Nota: Os resultados estatisticamente significativos estão apresentando em negrito.

Legenda: n, tamanho amostral, FC, *fold change*; p, valor de probabilidade.

Fold Change > 1: Indica aumento na expressão.

Fold Change < 1: Indica redução na expressão.

Fold Change = 1: Nenhuma mudança na expressão.

5 DISCUSSÃO

No que concerne ao perfil e características das pacientes envolvidas na pesquisa, evidenciou-se que a média de idade foi de $54 \pm 13,56$ anos, corroborando com as taxas de incidência trazidas pela literatura, onde a média de idade das mulheres diagnosticadas com CM varia globalmente, mas geralmente, o diagnóstico ocorre entre os 50 e 60 anos (Tan et al., 2020; Łukasiewicz et al., 2021).

Em nosso estudo, após a análise de expressão de *CD39* nas amostras de tecido tumorais de mama em relação aos PBMCs de pacientes com CM, observamos um aumento significativo na expressão desse gene. Recente trabalho mostrou que a superexpressão de *CD39* pode estar relacionada ao aumento de metástases e pior prognóstico, sendo essa uma hipótese para esse desfecho, já que a *CD39* tem envolvimento no TME (Baghbani et al., 2021b).

Contudo, quando analisamos a expressão de *CD39* nas PBMCs de pacientes com CM em relação aos controles, observamos uma menor expressão. Estudos recentes observaram que o antagonismo do *CD39* pode estabilizar o ATP extracelular pró-inflamatório, resultando em uma possível restauração da imunidade antitumoral (Moesta; Li; Smyth, 2020; Gheler et al., 2021).

A ativação dos receptores purinérgicos e a presença de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem ter um papel significativo na progressão tumoral. A Ado, por exemplo, exerce efeitos promotores do crescimento do CM, estimulando a proliferação celular, a angiogênese e a resistência à apoptose.

No entanto, as enzimas ectonucleotidases *CD39* e *CD73* têm um papel regulador importante nesse contexto. A atividade dessas enzimas resulta em uma redução dos níveis de nucleotídeos pró-inflamatórios e promotores do crescimento tumoral, e um aumento nos níveis de Ado. A Ado A adenosina (ADO) exerce um efeito imunossupressor significativo, o que representa um obstáculo tanto para a resposta do sistema imunológico ao tumor quanto para a eficácia das terapias adjuvantes, como quimioterapia e imunoterapia (Zimmermann, 2021). Esse efeito ocorre devido à capacidade da ADO de modular negativamente a ativação e a função de células do sistema imune, como linfócitos T, células NK e macrófagos, favorecendo o microambiente tumoral (Burnstock, 2012; Oliveira, 2013; de Araújo et al., 2021;).

O aumento do ATP extracelular, frequentemente associado à morte celular e inflamação, ativa as enzimas *CD39* e *CD73*, que catalisam a conversão sequencial do ATP em Ado A produção exacerbada de Ado no TME é um mecanismo sofisticado que os tumores utilizam para criar um ambiente permissivo ao seu crescimento e disseminação (Loi et al., 2013).

Ao inibir diretamente a ativação e proliferação de células T, células NK e outras populações imunológicas efetoras, a Ado favorece a tolerância imunológica ao tumor. Além disso, a sinalização mediada pelos receptores de Ado pode promover a diferenciação de macrófagos em um fenótipo pró-tumoral e aumentar a expansão de células T reguladoras, intensificando a imunossupressão. Este efeito cria um ciclo vicioso onde o TME não apenas inibe respostas imunes protetoras, mas também pode resistir aos efeitos imunomoduladores de terapias inovadoras, como os inibidores de checkpoint imunológico (Moesta; Li; Smyth, 2020; Allard et al., 2023).

Quanto aos resultados da correlação entre a expressão dos genes *CD39* e *CD73* em PBMCs de pacientes com CM e nos controles, ambos os genes têm papel crucial nas vias de sinalização do SP. Estudos de Moesta; Li e Smyth (2020) avaliaram o impacto das ectonucleotidases na imunidade tumoral, e observaram que níveis séricos de *CD73* podem prever que a expressão aumentada desse gene dentro do TME está associada a hipoxia e inflamação. Outro estudo também observou aumento da expressão da *CD73* em linfócitos de pacientes com CM de mau prognóstico (Baghbani et al., 2022b).

O *CD73* apresenta um nível de expressão elevado na maioria dos tumores sólidos humanos, sendo sua expressão e atividade diretamente relacionadas à maior invasividade e capacidade metastática do tumor. Estudos evidenciam que a adenosina extracelular gerada pela atividade do *CD73* nas células tumorais desempenha um papel crucial na mediação da evasão imune. Essa adenosina promove um microambiente imunossupressor, que favorece tanto o crescimento tumoral quanto a disseminação metastática (Rho et al., 2020; Bach et al., 2023).

Ainda, outros estudos afirmam que a redução da expressão de *CD39* sugere uma tentativa de evadir a resposta imune ao diminuir a produção de Ado, que pode suprimir a atividade imunológica contra o tumor (Koivisto et al., 2019; Zhu et al., 2021).

Uma meta-análise recente associou a alta expressão do *CD73* a uma menor sobrevida global e sobrevida livre de doença em diversos tipos de câncer, como de bexiga, ovário, próstata, rim, reto, vesícula biliar, mama, gástrico e colorretal. Em contrapartida, alguns estudos indicaram que a superexpressão de *CD73* pode estar associada a um prognóstico mais favorável em certos tipos de câncer, incluindo o câncer de ovário e de mama. Mesmo diante dessas divergências, a via *CD73*-Ado continua sendo um alvo terapêutico promissor, utilizando anticorpos anti-*CD73*, antagonistas de receptores de Ado e inibidores de pequenas moléculas (Huang et al., 2024).

A inibição do eixo *CD73*-*A2A* tem se tornado segundo alguns pesquisadores a melhor estratégia em se tratando de neutralizar os efeitos da adenosina bem como a inibição de *A2A* e *CD39*, podendo se tornar uma promessa como potencial terapêutico (Rho et al., 2020; Bach et al, 2023).

Embora os achados deste estudo tenham sido relevantes, algumas limitações devem ser consideradas como o tamanho e o tipo amostral. Estudos maiores podem fortalecer as conclusões e permitir análises mais robustas. O estudo foi conduzido em um contexto específico, podendo não representar todas as variações biológicas presentes em diferentes subtipos de câncer de mama. A inclusão de mais subtipos tumorais e estágios da doença pode fornecer uma visão mais abrangente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho revelou o aumento da expressão do gene *CD39* e *CD73*, fato esse que pode favorecer um ambiente imunossupressor, beneficiando as células tumorais. Os resultados indicam que a redução da atividade enzimática do *CD39* nas plaquetas, pode resultar no aumento do ATP sistêmico. Ambos os resultados corroboram a ideia de uma ação pró-tumoral do SP em pacientes com CM.

REFERÊNCIAS

- ALLARD, D. et al. The CD73 immune checkpoint promotes tumor cell metabolic fitness. **eLife**, v. 12, p. e84508, 1 jun. 2023.
- BACH, et al. “The Clinical Significance of CD73 in Cancer.” *International journal of molecular sciences* vol. 24,14 11759. 21 Jul. 2023, doi:10.3390/ijms241411759
- BACH, N. et al. The Clinical Significance of CD73 in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11759, 21 jul. 2023
- BAGHBANI, E. et al. Regulation of immune responses through CD39 and CD73 in cancer: Novel checkpoints. **Life Sciences**, v. 282, p. 119826, 1 out. 2021a.
- BAGHBANI, E. et al. Regulation of immune responses through CD39 and CD73 in cancer: Novel checkpoints. **Life Sciences**, v. 282, p. 119826, 1 out. 2021b.
- BAGHBANI, E. et al. Silencing tumor-intrinsic CD73 enhances the chemosensitivity of NSCLC and potentiates the anti-tumoral effects of cisplatin: An in vitro study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112370, jan. 2022a.
- BAGHBANI, E. et al. Silencing tumor-intrinsic CD73 enhances the chemosensitivity of NSCLC and potentiates the anti-tumoral effects of cisplatin: An in vitro study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112370, 1 jan. 2022b.
- BARNARD, M. E.; BOEKE, C. E.; TAMIMI, R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1856, n. 1, p. 73–85, ago. 2015.
- BEN-DROR, J.; SHALAMOV, M.; SONNENBLICK, A. The History of Early Breast Cancer Treatment. **Genes**, v. 13, n. 6, p. 960, 27 maio 2022.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **BioEssays**, v. 34, n. 3, p. 218–225, mar. 2012.
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017.
- BURSTEIN, H. J. et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 32, n. 10, p. 1216–1235, out. 2021.
- DE ARAÚJO, J. B. et al. Targeting the purinergic pathway in breast cancer and its therapeutic applications. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 2, p. 179–200, 1 jun. 2021a.
- DE ARAÚJO, J. B. et al. Targeting the purinergic pathway in breast cancer and its therapeutic applications. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 2, p. 179–200, 1 jun. 2021b.
- DE OLIVEIRA, S. F. V. et al. Characterization of MTAP Gene Expression in Breast Cancer Patients and Cell Lines. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0145647, 2016.
- DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441–5447, 31 out. 2012.

GHELER, F. V. et al. AMP hydrolysis reduction in blood plasma of breast cancer elderly patients after different treatments. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 10, p. 3719–3727, out. 2021.

HÄUSLER, S. F. M. et al. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, n. 10, p. 1405–1418, out. 2011.

HENNESSY, B. T. et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4116–4124, 15 maio 2009.

HUANG, T. et al. Current perspectives and trends of CD39-CD73-eAdo/A2aR research in tumor microenvironment: a bibliometric analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1427380, 2024.

Incidência. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controle-do-cancer-de-mama/dados-e-numeros/incidencia/incidencia>>. Acesso em: 31 out. 2024.

KASHYAP, D. et al. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 9605439, 2022.

KUCHENBAECKER, K. B. et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. **JAMA**, v. 317, n. 23, p. 2402–2416, 20 jun. 2017.

LOI, S. et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11091–11096, 2 jul. 2013.

ŁUKASIEWICZ, S. et al. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4287, 25 ago. 2021.

MICHAELS, E.; WORTHINGTON, R. O.; RUSIECKI, J. Breast Cancer: Risk Assessment, Screening, and Primary Prevention. **The Medical Clinics of North America**, v. 107, n. 2, p. 271–284, mar. 2023.

MOESTA, A. K.; LI, X.-Y.; SMYTH, M. J. Targeting CD39 in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 12, p. 739–755, dez. 2020.

OLIVEIRA, S. F. V. DE. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE REPARO DO DNA FA–BRCA E DO GENE MTAP EM CARCINOMAS MAMÁRIOS. 2013.

ROH, et al. “Targeting CD73 to augment cancer immunotherapy.” *Current opinion in pharmacology* vol. 53 (2020): 66-76. doi:10.1016/j.coph.2020.07.001 ROBERTS, S. A. et al. An APOBEC Cytidine Deaminase Mutagenesis Pattern is Widespread in Human Cancers. **Nature genetics**, v. 45, n. 9, p. 970–976, set. 2013.

ROBERTS, S. A. et al. An APOBEC Cytidine Deaminase Mutagenesis Pattern is Widespread in Human Cancers. **Nature genetics**, v. 45, n. 9, p. 970–976, set. 2013.

SANTONJA, A. et al. Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy. **Oncotarget**, v. 9, n. 41, p. 26406–26416, 29 maio 2018a.

SANTONJA, A. et al. Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy. **Oncotarget**, v. 9, n. 41, p. 26406–26416, 29 maio 2018b.

SARHANGI, N. et al. Breast cancer in the era of precision medicine. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 10, p. 10023–10037, out. 2022a.

SARHANGI, N. et al. Breast cancer in the era of precision medicine. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 10, p. 10023–10037, 1 out. 2022b.

SLEPICKA, P. F.; CYRILL, S. L.; DOS SANTOS, C. O. Pregnancy and Breast Cancer: Pathways to Understand Risk and Prevention. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 10, p. 866–881, out. 2019.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA CANCER J CLIN**, v. 71, n. 3, 2021.

TAN, P. H. et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. **Histopathology**, v. 77, n. 2, p. 181–185, ago. 2020.

TRAYES, K. P.; COKENAKES, S. E. H. Breast Cancer Treatment. **American Family Physician**, v. 104, n. 2, p. 171–178, 1 ago. 2021.

ZHI, X. et al. RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 24, n. 6, p. 439–448, 4 set. 2007.

ZHU, X. et al. P2X7 receptor: a critical regulator and potential target for breast cancer. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 99, n. 3, p. 349–358, mar. 2021.

ZIMMERMANN, H. History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 187, p. 114322, maio 2021.

ANEXO

Artigo submetido na revista Purinergic Signalling com dados da expressão genica.



Breast cancer patients present pro-tumor biomarkers related to purinergic signaling and oxidative stress¶

¶

Eduarda Valcarenghi, Graduate Program in Biomedical Sciences, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó - SC, Brazil. E-mail: eduardavalcarenghi@gmail.com. ORCID: 0000-0001-8695-163X¶

Simone Luciana Triquez, Graduate Program in Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis - SC, Brazil. E-mail: simone.triquez@gmail.com. ORCID: 0000-0003-4829-4717¶

Ana Paula Geraldi Norbah, Graduate Program in Nursery, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis - SC, Brazil. E-mail: ana-paula-geraldi@hotmail.com.br. ORCID: 0009-0004-9850-5142¶

Daiane Manica, Graduate Program in Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis - SC, Brazil. E-mail: daianemanica2011@hotmail.com. ORCID: 0000-0003-3126-954X¶

Keroli Eloiza Tessaro da Silva, Graduate Program in Biomedical Sciences, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó - SC, Brazil. E-mail: keroli_eloiza@outlook.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5737-057X¶

Karla Rackell Fialho Cunha, Undergraduate Course in Medicine, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó - SC, Brazil. E-mail: karlla.rackell@gmail.com. ORCID: 0009-0003-9497-8885¶

Nagilla Moreira Cordeiro, Undergraduate Course in Medicine, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó - SC, Brazil. E-mail: nagilla.moreirac@gmail.com. ORCID: 0009-0006-6318-4996¶

Marcelo Moreno, Clínica Ames, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó - SC, Brazil. E-mail: marcelo.moreno@uffs.edu.br. ORCID: 0000-0003-0244-9138¶

Débora Tavares de Resende e Silva, Graduate Program in Biomedical Sciences, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó - SC, Brazil. E-mail: debora.silva@uffs.edu.br. ORCID: 0000-0002-3813-7139¶

Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel, Graduate Program in Biomedical Sciences, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó - SC, Brazil. E-mail: sarah.maciel@uffs.edu.br. ORCID: 0000-0002-5746-7109¶

¶

Abstract¶

Breast cancer (BC) is a multifactorial disease. The purinergic system (PS) is a mediator of the immune system, and actively participates in the inflammatory process in cancer. Another highlight is the participation of oxidative stress (OS) markers and interleukins as predictors of BC progression and invasion. The activity of PS ectonucleotidases, OS markers, expression of interleukins, expression of P2X7, CD73 and CD39 genes and quantification of extracellular ATP were evaluated in BC patients, before surgical or pharmacological treatment, and in control participants, matched by sex and age. The results show reduced ATP and ADP hydrolysis in platelets, in addition to increased extracellular ATP in the BC group. Increased AMP hydrolysis was observed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). BC patients presented elevated oxidative parameters (MDA) and reduced antioxidant parameters (SOD and ascorbic acid), and reduction in interleukins TNF, IL4 and IL2. In PBMC from the BC group, the expression of P2X7 gene was significantly higher in relation to the expression of CD39 gene. Also, the expression of CD39 was 1.71-fold higher in tumor samples compared to PBMC from the BC group, and it was 0.11-fold lower in PBMC from the BC group compared to the controls. We conclude that ectoenzymes that hydrolyze ATP and ADP, mainly CD39, present reduced activity in the BC group, promoting an increase in extracellular ATP and culminating in a pro-inflammatory environment, favoring cancer progression. The increase in active oxidants and the reduction of antioxidants contribute to the progression of BC. Also, TNF and IL-4 demonstrate promising prognostic markers in BC.¶

Keywords: Breast cancer; Purinergic signaling; Oxidative stress; Inflammation.¶