

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

RAFAEL ZATTI ROSSETTO

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA
PROGRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

CHAPECÓ

2025

RAFAEL ZATTI ROSSETTO

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA
PROGRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas sob orientação da Prof^ª Dr^a Andreia Machado Cardoso.

CHAPECÓ

2025

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Rossetto, Rafael Zatti
AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA
NA PROGRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA /
Rafael Zatti Rossetto. -- 2025.
46 f.:il.

Orientadora: PhD Andréia Machado Cardoso
Co-orientadora: PhD Sarah Franco Vieira de Oliveira
Maciel

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas, Chapecó, SC, 2025.

1. Câncer de Próstata. 2. Expressão Gênica. 3.
Purinérgico. I. Cardoso, Andréia Machado, orient. II.
Maciel, Sarah Franco Vieira de Oliveira, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

RAFAEL ZATTI ROSSETTO

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA
PROGRESSÃO E DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

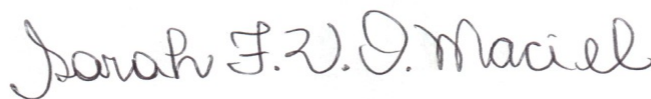
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas sob orientação da Prof.^a Dr.^a Andreia Machado Cardoso.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 11 de abril de 2025

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra.^a Andréia Machado Cardoso – UFFS
Orientadora



Prof.^a Dra.^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel – UFFS
Coorientadora



Prof.^a Dra.^a Debora Tavares De Resende e Silva – UFFS
Avaliadora

Maria Luiza Thorstenberg

Prof.^a Dra.^a Maria Luiza Thorstenberg – UNIFE
Avaliadora

Dedico este trabalho à minha família.

RESUMO

As mudanças do perfil de morbimortalidade do câncer de próstata (CPa) nas últimas décadas, têm tornado essa patologia um problema de saúde pública em vários países, inclusive no Brasil. Os processos inflamatórios e a sinalização purinérgica podem influenciar diretamente a progressão e desenvolvimento tumoral do CPa. A ação dos componentes da sinalização purinérgica, seus receptores e enzimas no microambiente tumoral da próstata é de crucial importância devido a sequência de eventos gerados, afetando os mecanismos moleculares. Considerando essa inter-relação com o CPa, o objetivo do presente estudo foi avaliar os componentes da sinalização purinérgica em pacientes diagnosticados com esse tipo tumoral. Trata-se de um estudo de análise quantitativa, observacional e transversal. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa (30 mL) de 39 pacientes com diagnóstico de CPa, anteriormente ao início do tratamento, no momento da cirurgia para retirada do tumor, e de 37 indivíduos controle, de faixa etária semelhante. Foram analisadas a expressão gênica das enzimas do sistema purinérgico CD39 e CD73, e do receptor P2X7, além da expressão protéica de CD39, em linfócitos dos pacientes e controles. Os dados gerados foram analisados quanto a sua normalidade aplicando-se o teste de Shapiro-Wilk. Após, foi utilizado o Teste t de Student para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos, para fazer as comparações das expressões entre os grupos. Para as correlações entre as variáveis estudadas, foram utilizados os testes de Pearson para dados paramétricos e Spearman para dados não-paramétricos. O nível de significância utilizado foi de 0,05, e as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.1. A média de idade dos pacientes com CPa foi de 66 anos, sendo 74,3% casados e 82,1% não fumantes. Além disso, 87,2% não haviam tido diagnóstico prévio de COVID-19, 61,5% não apresentavam diabetes mellitus (DM) ou hipertensão (HAS) e 84,6% não tinham histórico familiar de CPa em parentes de primeiro grau. Como resultados com significância estatística, observou-se o aumento da expressão gênica do receptor P2X7 ($p < 0,0260$), da enzima CD39 ($p < 0,0125$) e CD73 ($p < 0,0268$) no grupo de pacientes com CPa em relação ao grupo controle, bem como a correlação positiva entre a expressão gênica de P2X7 e CD39 no grupo controle ($p < 0,0266$). Através deste trabalho, pode-se destacar a relevância da cascata de sinalização purinérgica derivada do processo tumoral na próstata, impactando no padrão pró-inflamatório e imunossupressor do microambiente tumoral. Como perspectivas futuras, explorar as vias de sinalização purinérgica integrando moduladores com terapias existentes, como imunoterapias, pode ser uma boa estratégia, assim como terapias envolvendo biomarcadores relacionados a vias de sinalização sinérgicas ao sistema purinérgico e o CPa.

Palavras-chave: Câncer de próstata, Expressão Gênica, Purinérgico.

ABSTRACT

Changes in the morbidity and mortality profile of prostate cancer (PCa) in recent decades have made this pathology a public health problem in several countries, including Brazil. Inflammatory processes and purinergic signaling can directly influence the progression and tumor development of PCa. The action of purinergic signaling components, their receptors and enzymes in the tumor microenvironment of the prostate is of crucial importance due to the sequence of events generated, affecting the molecular mechanisms. Considering this interrelationship with PCa, the objective of the present study was to evaluate the components of purinergic signaling in patients diagnosed with this tumor type. This is a quantitative, observational and cross-sectional study. Blood samples were collected by venipuncture (30 mL) from 39 patients diagnosed with PCa, prior to the beginning of treatment, at the time of surgery to remove the tumor, and from 37 control individuals of a similar age group. The gene expression of the enzymes of the purinergic system CD39 and CD73, and of the P2X7 receptor, in addition to the protein expression of CD39, in lymphocytes of patients and controls, were evaluated. The data generated were analyzed for normality using the Shapiro-Wilk test. Afterwards, the Student's t-test was used for parametric data and the Mann-Whitney test for non-parametric data to make comparisons of expressions between the groups. For the correlations between the variables studied, Pearson's test for parametric data and Spearman's test for non-parametric data were used. The significance level used was 0.05, and statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8.0.1 software. The mean age of the patients with PCa was 66 years, and 74.3% of them were married and 82.1% were nonsmokers. In addition, 87.2% have not had a previous diagnosis of COVID-19, 61.5% did not have diabetes mellitus (DM) or hypertension (SAH), and 84.6% had no family history of PCa in first-degree relatives. As statistically significant results, it was observed the increase in gene expression of the P2X7 receptor ($p < 0.0260$), the enzyme CD39 ($p < 0.0125$) and CD73 ($p < 0.0268$) in the group PCa compared to the control group, as well as the positive correlation between the gene expression of P2X7 and CD39 in the control group ($p < 0.0266$). Through this work, the relevance of the purinergic signaling cascade derived from the tumor process in the prostate can be highlighted, impacting the pro-inflammatory and immunosuppressive patterns of the tumor microenvironment. As future perspectives, exploring purinergic signaling pathways by integrating modulators with existing therapies, such as immunotherapies, may be a good strategy, as well as therapies involving biomarkers related to synergistic signaling pathways to the purinergic system and PCa.

Key-words: Prostate cancer, genic expression, purines

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 OBJETIVO GERAL.....	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
3.1 CÂNCER DE PRÓSTATA.....	7
3.2 SISTEMA PURINÉRGICO E CPa.....	9
3.3 O PAPEL DA CD39 E CD73 NO CPa.....	13
3.4 O PAPEL DOS RECEPTORES P2 NO CPa.....	14
4. METODOLOGIA.....	17
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	17
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	18
4.2.1 Coleta das amostras biológicas.....	18
4.2.2 Processamento e separação dos linfócitos.....	18
4.2.3 Extração de RNA dos linfócitos.....	19
4.2.4 Tratamento do RNA com DNase.....	19
4.2.5 Retrotranscrição do RNA.....	20
4.2.6 Análise de Expressão Gênica por RT-qPCR.....	20
4.2.7 Expressão proteica por citometria de fluxo.....	21
4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	21
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXO 1.....	34
ANEXO 2.....	36

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CPa) é uma das principais ameaças à saúde masculina em todo o mundo, sendo o segundo tipo de câncer mais diagnosticado globalmente entre os homens. Em 2023, estimou-se que o CPa tenha representado aproximadamente 15% de todos os novos diagnósticos de câncer em homens, com cerca de 1,4 milhão de casos detectados anualmente. A doença também é uma das principais causas de mortalidade por câncer no sexo masculino, contribuindo para cerca de 375.000 mortes por ano, evidenciando seu impacto significativo na saúde pública mundial (IARC, 2023).

Em consonância com a sua alta prevalência, assim também ocorre com os processos acarretados com o avanço da doença. Para que haja uma assertividade quanto ao tratamento, a classificação tumoral e os graus de diferenciação celulares são definidos através de exames como a biópsia prostática, o que contribui para distinguir os tumores (Egevad, 2019).

As interações envolvendo a sinalização purinérgica e as espécies reativas de oxigênio (ERO's) são cruciais em contextos de alteração do ciclo celular como a proliferação das células tumorais, mudanças nos mecanismos de apoptose, angiogênese, hipóxia entre outros. A produção de adenosina trifosfato (ATP) extracelular ligado aos receptores P2 está intimamente relacionado ao aumento da produção de ERO's por mudanças nos canais iônicos, assim como enzimas catalisadoras destes nucleotídeos, como a CD39 e CD73, também apresentam alterações significativas em sua atividade e/ou expressão no CPa (Di Virgilio, 2016).

Dado o cenário mundial envolvendo o CPa, torna-se essencial aprofundar o entendimento sobre os mecanismos moleculares que impulsionam o avanço dessa doença. A sinalização purinérgica desempenha um papel crucial em processos chave do microambiente tumoral. Assim, essas interações podem revelar novas estratégias terapêuticas direcionadas à modulação do microambiente tumoral, oferecendo uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, que melhorem tanto o prognóstico quanto a qualidade de vida dos pacientes com CPa.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os componentes da sinalização purinérgica no câncer de próstata.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar clinicamente a população do estudo;
- Analisar a expressão das enzimas do sistema purinérgico e do receptor P2X7 em pacientes com diagnóstico de CPa e em indivíduos controle;
- Correlacionar as expressões de tais componentes com parâmetros clínicos;
- Produzir manuscrito correlacionando a sinalização purinérgica e estresse oxidativo na presença de CPa.

3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

O CPa afeta principalmente homens em idade média, tipicamente entre 45 e 60 anos, e detém a maior taxa de mortalidade atualmente entre os cânceres masculinos. O diagnóstico desse câncer envolve uma série de testes, incluindo biópsia de próstata, medição de antígeno prostático específico (PSA), exame digital retal, ressonância magnética e outros métodos de triagem, como o escore de Gleason, que delimita características no fenótipo da doença. Além disso, vários fatores de risco contribuem para a natureza heterogênea do CPa, incluindo idade, obesidade, síndrome metabólica, histórico familiar e influências relacionadas ao estilo de vida com baixa qualidade em saúde (Achard, 2021; Boerrigter *et al.*, 2020).

As interações entre as relações genéticas, como mutações em oncogenes ou genes supressores de tumor, além das dinâmicas sociais, levam a variações nas taxas de sobrevivência do CPa, resultando em características distintas nos diversos locais do mundo. Já é postulado entre a comunidade científica global que as bases genéticas do CPa desempenham um papel primário no aparecimento da patologia, mas que fatores como o tabagismo e o sedentarismo, por exemplo, podem ter um papel significativo na mortalidade alta desse câncer (Cirne *et al.*, 2022).

O manejo do CPa representa em si um desafio para a pesquisa biomédica e afeta significativamente os contextos da saúde pública devido ao alto índice de ocorrência. Apesar dos avanços em seu diagnóstico e tratamento nos últimos anos, ainda existem desafios no que diz respeito a avaliações de risco, levando a um tratamento ora excessivo ora insuficiente, o que condiciona um obstáculo para posteriores terapêuticas (Costello *et al.*, 2020).

Pesquisas genômicas denotam os mecanismos moleculares que levam ao aparecimento e desenvolvimento de determinados tipos de cânceres, incluindo alguns rearranjos cromossômicos e mutações genéticas. Essas representam uma força significativa na patogênese do CPa, com genes envolvidos na via androgênica e no metabolismo da testosterona, como seu papel envolvendo a regulação do crescimento do epitélio prostático bem como da proliferação de células tumorais (Vietri *et al.*,

2021).

Modalidades terapêuticas como a quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal com a privação de andrógenos, além da cirurgia de prostatectomia radical, são parte fundamental no manejo da doença, assim como o entendimento das vias de sinalização envolvendo o contexto do CPa, aparecem como potencial modalidade terapêutica, como é o caso da sinalização purinérgica. Elencar a melhor terapia pode não ser fácil, pois depende de vários fatores, como o estágio da doença, a presença de metástase ou o risco de recidiva (Vaghari-Bagari *et al.*, 2021).

O prognóstico segue uma linha semelhante à da escolha do tratamento adequado, a depender de fatores como as características tumorais, e abrange diferentes níveis de mortalidade e morbidade. A classificação do tumor como um adenocarcinoma originário de células acinares tende a ter um prognóstico mais favorável em comparação aos que se originam das células ductais. A maioria dos indivíduos diagnosticados com o CPa apresentam a patologia de forma localizada, limitada à próstata. Além disso, um diagnóstico em estágio inicial contribui com as expectativas de vida aumentadas (Gandaglia *et al.*, 2021).

A adaptação de uma estratégia de tratamento eficaz é essencial, uma vez que a grande maioria dos diagnósticos são relacionados a falta de sintomas, e deste modo podendo já haver uma progressão lenta e por vezes até inerte, sendo necessário adequar o tratamento, já que nos casos sintomáticos, por muitas vezes o fenótipo desta patologia já apresenta uma agressividade maior, mesmo após o tratamento definitivo. Assim, aumentam-se as chances de uma recidiva e a resistência aos métodos convencionais de cuidado (Cirne *et al.*, 2022; Costello *et al.*, 2020).

A condição de heterogeneidade tumoral é uma observação comum no CPa localizado, frequentemente havendo diversidades morfológicas no mesmo indivíduo, uma vez que a glândula prostática pode conter vários focos de tumor em diferentes zonas (conhecidos como heterogeneidade intertumoral), centrais ou periféricas, exibindo perfis genéticos distintos entre si e que apresentam diferentes potenciais em relação ao aparecimento de metástases, proliferação e invasão celular, e possível resistência ao tratamento (Bekelman *et al.*, 2018).

Essa diversidade genômica presente no CPa localizado desafia a ideia de que haja um único marcador dominante que dita a trajetória clínica do indivíduo, o que mais uma vez demonstra a importância do estudo de diferentes vias de sinalização. Além disso, as células tumorais podem se originar de diferentes tipos celulares,

passando por transformações e mutações individuais, ou uma mutação que desencadeia em múltiplos clones dentro de um mesmo local (conhecido como heterogeneidade intratumoral) (Bekelman *et al.*, 2018).

As metástases no CPa geralmente estão localizadas em tecidos adjacentes e regionais, como linfonodos ou ductos e vesículas, sendo que o aparecimento de metástases distantes se dá principalmente no tecido ósseo. A grande maioria dos indivíduos que apresentam a condição de metástase, local ou distante, tendem a progredir para uma resistência à prostatectomia radical, e sendo não responsivos às terapias de privação de andrógenos, o que influencia na mortalidade pela doença (Penar *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2021).

As metástases distantes, para além dos tecidos regionais, aparecem em menos de um décimo dos pacientes, porém quando estas são diagnosticadas tardiamente, envolvem uma taxa de sobrevida de 30% ao longo de cinco anos. As células do CPa metastático têm a capacidade de permanecer inertes dentro do microambiente tumoral em locais secundários por períodos prolongados. Além disso, muitos homens irão apresentar complicações relacionadas ao tratamento por mais de uma década após o diagnóstico, o que faz de terapias complementares, como o biofeedback, terem um papel importante nas funções de saúde masculina (Achard *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2021).

3.2 SISTEMA PURINÉRGICO E CPa

O sistema purinérgico é composto por moléculas sinalizadoras, enzimas conversoras de nucleotídeos (purinas) e nucleosídeo (pirimidinas), e seu conjunto de 19 receptores específicos para esse sistema. Dentro desse conjunto de moléculas sinalizadoras destacam-se o ATP, a adenosina difosfato (ADP) e a adenosina (ADO). A adenosina monofosfato (AMP) não atua como molécula sinalizadora, embora ainda assim esteja relacionado em sua degradação por uma enzima específica que a converte em ADO (Burnstock, Di Virgilio, 2013).

A respeito das enzimas catalisadoras desses processos de degradação, encontram-se a família das ectonucleotídeo trifosfato difosfohidrolase (ENTPDase), mais comumente expressa no processo canceroso em seu subtipo 1, também

conhecida como CD39. Esta, degrada o ATP em ADP e o ADP em AMP. Outra enzima relacionada à degradação dessas moléculas é a ecto-5'-nucleotidase, ou CD73, e que converte o AMP em ADO (Di Virgilio, Adinolfi, 2015).

Para a degradação da ADO, encontra-se a enzima adenosina desaminase (ADA), e que também desempenha um papel importante no contexto do CPa, convertendo a ADO em inosina. Estas enzimas formam os compostos enzimáticos da sinalização purinérgica mais relacionados aos processos cancerosos, sendo as mais importantes e as mais estudadas em sua atividade ou expressão (Burnstock, Di Virgilio, 2013).

Já em relação aos receptores deste sistema de sinalização, fazem parte os receptores da família P1, correspondendo a ligação com a ADO (A1, A2A, A2B e A3), e os receptores da família P2, correspondendo a ligação com o ATP e ADP (P2X, sendo 7 subtipos, e P2Y, sendo 8 subtipos). Os eventos que se associam as etapas de proliferação das células tumorais geram um microambiente inflamatório sem que se chegue na etapa da resolução, o que favorece a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), uma vez que esse processo ocorre de forma dinâmica entre proliferação e lesão ou destruição celular (Di Virgilio *et al.*, 2020).

Um desses mecanismos associados a um DAMP é correspondente ao ATP, onde este tem papel crucial de ativação inflamatória, sendo antagonista da ADO (anti-inflamatória), tornando-se um componente de vital importância na sinalização purinérgica relacionado aos processos cancerosos, principalmente na progressão e no desenvolvimento das neoplasias malignas (Burnstock & Knight, 2004).

Esses sinalizadores de modo geral, respondem a processos como estímulo ou inibição da apoptose, proliferação e diferenciação celular, angiogênese tumoral, vias de sinalização ativadas pela hipóxia (HIF-1), mudanças na bioenergética e no DNA mitocondrial (Zip1-3), e ativação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), assim como outros fatores e vias de sinalização que de igual forma se relacionam com a sinalização purinérgica (Hanahan & Weinberg, 2011).

Sabe-se que a mutação em genes supressores de tumor, como o TP53, pode acarretar na proliferação celular descontrolada, e o ATP, sendo um dos marcadores expressos de forma aumentada nesse contexto, converge para uma inadequação bioenergética das células tumorais, envolvendo também as enzimas e seus receptores específicos da família P2 (Burnstock & Verkhratsky, 2012).

O nucleosídeo ADO, por exemplo, é encontrado em níveis elevados em desenvolvimentos cancerosos, uma vez que sua função anti-inflamatória tem uma tentativa de interromper os danos moleculares, porém, é capaz de induzir o crescimento tumoral em condições exacerbadas de sua expressão, uma vez que está associado a indução de angiogênese e do estado imunossupressor das células malignas, desta forma também ativando receptores e enzimas para degradá-la (Allard et al., 2020).

A exploração de vias adicionais para além das vias comumente estudadas e que se associam ao desequilíbrio dos receptores purinérgicos da classe P2, por exemplo, vem contribuindo com a obtenção de novas perspectivas no processo da doença e no direcionamento terapêutico. Assim, destaca-se esses receptores como biomarcadores e alvos terapêuticos importantes para o manejo do CPa, como no manejo de dor e do perfil inflamatório desses indivíduos (Burnstock & Di Virgilio, 2013).

Pesquisas demonstraram que o receptor P2X7 está expresso de forma anormal no CPa, relacionado inclusive ao nível do PSA, podendo este ser um biomarcador precoce da doença, quando não há possibilidade de biópsia. Além de ativar outras vias de sinalização associadas a proliferação celular, o P2X7 se relaciona ao fenótipo agressivo do CPa pela invasão e metástase de células tumorais por meio de genes relacionados a invasão mesenquimal epitelial e vias de sinalização como a PI3K/AKT, vias de fosforilação importantes em processos tumorais (Adinolfi et al., 2015).

Outros estudos sugerem que o receptor P2X7 tem um papel fundamental no surgimento e desenvolvimento do CPa, sendo relacionado a angiogênese, ativação de fatores de crescimento, impedimento da apoptose e outros. Processos terapêuticos de inibição desses receptores tem futuro promissor no que tange a supressão da progressão do CPa (Moesta, 2020; Di Virgilio, 2009).

3.3 O PAPEL DA CD39 E CD73 NO CPa

A enzima CD39 possui em sua estrutura 510 aminoácidos, sendo abrigados resíduos de cisteína e sítios de glicosilação. Em sua atividade, o domínio extracelular é maior e é o responsável pela atividade dessa nucleotidase. Ela está localizada na superfície celular e catalisa a hidrólise de ATP e ADP, para produzir o monofosfato

correspondente. Sua expressão é induzida por diversas citocinas inflamatórias, privação nutricional, estresse oxidativo e por ação de alguns fatores de transcrição e de crescimento (Gardani *et al.*, 2019; Moesta *et. al*, 2020; Liu *et. al*, 2022). A CD73 é uma enzima ligada à membrana celular encontrada na maioria dos tecidos. Esta, auxilia na hidrólise dos monofosfatos gerados pela CD39 para a conversão em ADO. Em particular, esta enzima está fortemente ligada com a geração de ADO no microambiente tumoral, exercendo papel importante na imunossupressão e promovendo a angiogênese (Liu *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2023).

A ADO extracelular pode ser produzida por difusão passiva ou transporte ativo de ADO intracelular. Por outro lado, também pode ser gerada pelos mecanismos de hidrólise do ATP extracelular. Em tumores sólidos, como é o caso do CPa, o ATP é liberado no espaço extracelular devido a fatores como hipóxia, inflamação, privação nutricional ou até mesmo necrose celular e drogas citotóxicas, como a dihidrotestosterona (DHT) em excesso (Allard *et al.*, 2017; Burnstock, 2013).

O ATP liberado no espaço extracelular é convertido em AMP pela enzima CD39, e então posteriormente hidrolisado em ADO pela CD73. É importante ressaltar, que tanto uma enzima quanto a outra são altamente expressas nos tipos celulares diferenciados dentro do microambiente tumoral, seja em células tumorais, imunes ou endoteliais (Moesta, 2020; Di Virgilio, 2009).

Recentemente descobriu-se que os exossomos ou vesículas extracelulares carregam as enzimas CD39 e CD73 na superfície, sendo constantemente gerados na presença de tumores, promovendo um aumento dessas enzimas no microambiente tumoral em diferentes tipos de câncer, exercendo uma alta atividade hidrolítica de ATP e AMP, o que pode ser o grande mecanismo que leva ao aumento dos níveis de ADO no ambiente tumoral (Chen *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2023).

Vale a pena destacar que a ADO é conhecida por suprimir a atividade de diversas células imunes, tendo em vista seu perfil anti-inflamatório, suprimindo células como fagócitos, células dendríticas, células *natural killers*, células T, como a Th17, células B e macrófagos, ao se ligar com o receptor A2A na sua superfície celular. Porém, nem sempre este contexto é deletério, já que a ADO também pode promover a ativação de algumas células imunes reguladoras e supressoras, como as células supressoras derivadas de mieloides e células T reguladoras (Tregs), para diminuir a atividade tumoral (Chow *et al.*, 2022; Allard *et al.*, 2020).

A expressão de CD39 em tumores humanos e em células imunes infiltrantes

nesse processo tem sido descrita amplamente pela comunidade científica, sendo promissora como um marcador prognóstico. Níveis elevados de RNA mensageiro (mRNA) de CD39 correlacionam com uma melhor taxa de sobrevida a longo prazo após a ressecção tumoral. Em diferentes carcinomas, mostrou-se uma alta expressão de CD39 em tumores primários tanto quanto os metastáticos, embora mostrou-se que a combinação dos níveis de CD39 e CD73 em conjunto fornece um melhor valor prognóstico em detrimento da CD39 de forma isolada (Baghbani *et al.*, 2021).

Já a expressão da CD73 no microambiente tumoral em vários tipos de câncer é associada à indução da hipóxia, uma relação de perfusão tecidual inadequada e ativação e estabilização de fatores de transcrição relacionados à hipóxia, como o HIF-1. Outras vias de sinalização tumoral como a transição epitelial-mesenquimal, ou mutações em genes como TP53 ou *rat sarcoma virus* (RAS), ou a perda da sinalização do receptor de estrogênio (ER), também foram associados ao aumento da expressão de CD73 (Di Virgilio, 2020).

Como consequência deste processo, a ADO derivada da atividade da CD73 aumenta no ambiente tumoral e exerce múltiplas ações imunossupressoras para reduzir a imunidade antitumoral. A associação com características clínicas e patológicas foram estudadas em diversos tipos de cânceres, incluindo o CPa. Em geral, esses estudos demonstraram que os altos níveis da expressão da CD73 estão associados a piores resultados clínicos, mas não em sua totalidade (Xia *et al.*, 2023).

3.4 O PAPEL DOS RECEPTORES P2 NO CPa

Os receptores purinérgicos têm envolvimento com as purinas, incluindo o ATP, ADP, AMP e ADO, desempenhando um papel crucial no microambiente tumoral. Como dito anteriormente, são categorizados em P1 e P2. Os receptores P2 são subdivididos em P2X e P2Y, apresentando os receptores sensíveis a canais iônicos (P2X) e os receptores acoplados à proteína G (P2Y) (Burnstock, Di Virgilio, 2009).

Dentro dos P2XR, os receptores de canais iônicos, as mudanças na expressão desse canal bem como a atividade tumoral modulam a proliferação e a apoptose induzida nas células tumorais. A angiogênese tumoral é influenciada pelos canais iônicos de potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}), enquanto a invasão tumoral e a metástase são

afetadas por outros canais, como os de sódio (Na^+) e cloro (Cl^-). Além disso, os receptores acoplados à proteína G (P2Y), desempenham um papel na progressão metastática do câncer e são alvos promissores para as modalidades terapêuticas no manejo do câncer, sendo frequentemente alvos de inibidores em pesquisas em humanos (Wang *et al.*, 2023).

Os receptores P2 têm um papel vital e crítico no microambiente tumoral, onde a sua ativação ou inibição pode induzir a morte das células cancerosas, o que é benéfico, ou até mesmo continuar a promover o crescimento celular desordenado. Ainda, a estimulação desses receptores muitas vezes desencadeia uma resposta inflamatória, o que contribui para a ativação do sistema imune, porém, de outra forma ativa mecanismos imunossupressores dentro do microambiente tumoral. A ativação destes pode estimular a proliferação celular por meio da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (Tafari *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que o receptor P2X7 está presente em diversos tipos de cânceres, e é especialmente essencial para o crescimento tumoral. De uma forma geral, evidências mostram que os P2XR desempenham várias funções em tumores, influenciando a proliferação celular, diferenciação tumoral, angiogênese, metástase, presença de algia relacionada ao câncer bem como a imunidade das células tumorais resistentes (Qiao *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023).

Os P2XR ativados por ATP são expressos em várias etapas do CPa, incluindo o câncer localizado, os metastáticos e resistentes a ressecção tumoral, e aqueles resistentes às terapias de privação de andrógenos, especialmente os receptores P2X4, P2X5 e P2X7. Entre esses, o P2X7 tem sido envolvido em promover o crescimento das células tumorais da próstata, facilitando o influxo de Ca_{2+} ou alterando a bioenergética mitocondrial (Adinolfi *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que o estresse hipotônico, condição em que uma célula é exposta em um ambiente com uma concentração menor de soluto do que o seu interior, pode iniciar um ciclo de proliferação celular gerado pelo feedback da liberação de ATP e, conseqüente, sinalização do receptor purinérgico, levando a níveis elevados de Ca^{2+} intracelular e ativação de outras vias, como as cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), favorecendo a continuidade do ciclo celular, bem como a ERK e a via PI3K (Amoroso *et al.*, 2015; Lertsuwan *et al.*, 2017).

Além da via da MAPK estar associada à proliferação celular através da sinalização dos receptores e expressão do ATP, ela desempenha um papel na

regulação da morte celular em tumores sólidos, a depender do estímulo específico e do tipo celular envolvido. No CPa, esta via (p38-MAPK) ativa pode promover a apoptose, embora esse processo também dependa da combinação com outros sinais, como a via PI3K/AKT (Di Virgilio *et al.*, 2017).

A via PI3K/AKT, juntamente com a cascata de sinalização celular envolvendo a MAPK, pode impulsionar a progressão do CPa. Assim, terapias de privação de andrógenos e outras terapias que visam modular esta via estão sendo estudadas como potencial terapêutico, interferindo na clínica e na progressão patológica. Além disso, o HIF-1 pode modular o P2X7 com feedback positivo, aumentando a sua característica de invasividade e promovendo a angiogênese em ambientes tumorais com a presença de hipóxia (Baghbani *et al.*, 2021; Xia *et al.*, 2023).

Outro fato importante, é de que tumores com alta expressão de P2X7 estão associados ao aumento de VEGF, e a presença de uma ampla rede vascular desencadeada por este. Outros estudos demonstram que a redução desse receptor leva a níveis reduzidos de HIF-1 e VEGF, inibindo consequentemente a angiogênese promovida por estes fatores (Di Virgilio *et al.*, 2017).

A hipóxia ativada pelo HIF-1 induz a expressão do P2X7 para produtos finais de glicação avançada (RAGE), também importantes em contextos de estresse oxidativo. Ainda, a expressão de P2X7 e RAGE facilita a fosforilação de AKT e ERK. Por outro lado, o HIF-1 contribui para a invasão tumoral e metástase ao aumentar a atividade e outras proteínas como a mieloproteínase de matriz 9 (MMP-9), responsáveis por degradar a matriz extracelular, promover angiogênese tumoral e facilitar a invasão tumoral e metástase (Liu *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2023).

Ao mesmo tempo, o receptor P2X4 está relacionado com a formação do CPa e emerge como um alvo promissor para intervenções terapêuticas. A sua ativação aumenta a migração e invasão de células do CPa por meio dos mecanismos de transição epitélio-mesenquimal (EMT). Além disso, os níveis elevados desse receptor foram observados em células do CPa que exibem perda de proteínas como a fosfatase homóloga a tensina (PTEN, que atua como inibidor da via PI3K), onde a expressão aumentada de P2X4 se relaciona com maior risco de metástase, uma vez que esta proteína leva a desfosforilação de AKT. A forma ativa da AKT está relacionada a piores prognósticos em diversos tipos de cânceres, enquanto a expressão aumentada do P2X4, combinada com a perda de PTEN, se correlaciona com um risco aumentado de metástase e recorrência dos níveis altos de PSA após a prostatectomia. Estudos

demonstram que a inibição deste receptor diminui a sobrevivência das células cancerígenas, podendo ser promissor como modalidade terapêutica (Di Virgilio, Adinolfi, 2015).

Os receptores P2Y demonstram seu papel na progressão e metástase. Porém, nem todos os subtipos desempenham o mesmo efeito, os receptores P2Y1 tendem a inibir a proliferação celular no câncer, enquanto os P2Y2 a promovem. Estudos em linhagem celular de CPa demonstraram que a ativação de P2Y2 levou a fosforilação de p38, aumentando a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e aumentando a resistência à apoptose das células tumorais, ao contrário do P2Y1, que induziu a morte celular e suprimiu a proliferação das células da linhagem de CPa (Allard *et al.*, 2017; Burnstock, 2013).

Em outras pesquisas, demonstrou-se que o ATP aumentou a invasão e migração de células tumorais do CPa por meio de P2YRs. A supressão do receptor P2Y2 impediu significativamente a invasão e migração induzidas pelo ATP em células de CPa, destacando dessa forma o envolvimento desses receptores nos processos cancerígenos (Burnstock, Di Virgilio, 2013).

O entendimento sobre as implicações do sistema purinérgico nos diversos tipos de câncer, incluindo o CPa, vem se tornando uma importante ferramenta na elucidação dos mecanismos patológicos, e que podem influenciar no prognóstico e na terapêutica geral dos indivíduos com esse diagnóstico. Sendo assim, a compreensão desse sistema, juntamente com outros sinérgicos no processo do desenvolvimento do CPa, se faz de suma importância para a pesquisa biomédica.

4. METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob protocolo número: 87508918.4.0000.5564.

O presente estudo é caracterizado como quantitativo observacional transversal.

Com relação à seleção da amostra, ela foi realizada por conveniência e coletou-se material sanguíneo de 39 pacientes recém diagnosticados com CPa no período de setembro de 2021 a março de 2023. No estudo as enzimas analisadas foram a ENTPDase 1 (CD39), a CD73, bem como a expressão do receptor P2X7 anteriormente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico. O grupo controle foi composto por 37 homens, com idades semelhantes às do grupo investigado e que não apresentavam diagnóstico de CPa. Os pacientes foram selecionados a partir de contato prévio dos pesquisadores com o médico cirurgião responsável pela avaliação dos pacientes no Hospital Regional do Oeste (HRO), e os pacientes selecionados foram informados pelos pesquisadores sobre os objetivos da pesquisa e sobre as intervenções que seriam realizadas caso aceitassem participar, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Após a seleção, pacientes e controles foram contactados pelos pesquisadores para realização de uma única coleta de sangue, no volume de 30 mL, por punção venosa. As análises bioquímicas e moleculares foram realizadas nos laboratórios de pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - *Campus* Chapecó (SC). As informações de prontuário médico foram obtidas nas pastas dos pacientes arquivadas no HRO, e foram utilizadas para complementar as análises biológicas. A partir dessas análises, foi realizada a comparação dos resultados obtidos entre os grupos e a verificação de alterações nos sistemas biológicos avaliados devido à presença do CPa.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1 Coleta das amostras biológicas

Em relação à seleção dos participantes, a amostragem foi feita por conveniência, e coletou-se trinta e nove (n= 39) pacientes com diagnóstico de CPa, e trinta e sete (n= 37) indivíduos controle, pareados por idade e sexo, na cidade de Chapecó (SC), seguindo os critérios de inclusão e de exclusão. Logo após o diagnóstico, os indivíduos foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, e foram convidados a participar do mesmo, consentindo, através de assinatura do TCLE, a fornecer as informações dos laudos de exames e biópsias realizadas e dos prontuários médicos. Após, foi realizada coleta de sangue em tubos *vacutainer* com éter-diaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (para a separação de linfócitos). A coleta de sangue dos pacientes e controles foi realizada em um único momento, após o resultado da biópsia realizada, e antes do início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico do CPa no caso dos pacientes. Os linfócitos foram acondicionados em microtubo tipo *ependorf*, armazenados em caixas específicas, identificadas e congeladas em freezer a -80 °C para as posteriores análises. As informações obtidas a partir dos prontuários médicos foram aquelas em relação à idade, histologia, TNM, graduação histológica (escore de Gleason), níveis séricos de PSA, escore da *International Society of Urological Pathology* (ISUP), história familiar de câncer e doenças crônicas.

4.2.2 Processamento e separação dos linfócitos

Para o isolamento 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 (Ficoll-Histopaque) e realizou-se centrifugação a 1800 rotações por minuto (rpm), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após a centrifugação, através da formação de um gradiente de

densidade, é possível visualizar uma camada intermediária composta pelas células mononucleares (linfócitos e monócitos) entre as camadas de plasma e Ficoll. Esta nuvem de células foi cuidadosamente removida e transferida para tubo cônico limpo. Às células, foi adicionada solução salina e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1800 rpm. Na sequência, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 5 mL de tampão hemolítico aos linfócitos, procedendo nova centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de solução salina, homogeneizando o conteúdo e realizando-se nova centrifugação por 5 minutos a 1800 rpm. Após o término desse processo, os linfócitos foram guardados em *eppendorfs* contendo 600 µL de solução salina. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até a realização dos experimentos (Leal, 2005).

4.2.3 Extração de RNA dos linfócitos

Foi utilizado o reagente Trizol para o isolamento de RNA a partir dos linfócitos, conforme protocolo padrão recomendado pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Para a extração, adicionou-se 1 ml de Trizol ao pellet de linfócitos, seguindo todas as instruções fornecidas pelo fabricante. Após a extração do RNA, realizou-se a quantificação do ácido nucleico utilizando o espectrofotômetro Nanodrop, onde foram aplicados 2 µL da amostra no equipamento para obtenção das leituras.

4.2.4 Tratamento do RNA com DNase

O RNA extraído (até 10 µg de RNA em 50 µL de solução) foi submetido ao tratamento com a enzima DNase I (Ambion, Thermo Fisher Scientific) para eliminar qualquer fragmento de DNA genômico que pudesse estar contaminando a amostra, de acordo com as orientações do fabricante.

4.2.5 Retrotranscrição do RNA

Para a conversão do RNA em DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Em cada reação, 10 µL de RNA tratado com DNase, com concentração de 200 ng/µL, foram misturados com 10 µL de master mix do kit, composto por 2,0 µL de tampão enzimático 10X, 0,8 µL de dNTPs 25X, 2,0 µL de iniciadores randômicos 10X, 1,0 µL da enzima transcriptase reversa e 4,2 µL de água ultrapura, totalizando um volume de 20 µL. As reações de retrotranscrição foram então submetidas a um ciclo de temperatura que consistiu em 25°C por 10 minutos, seguido por 37°C por 120 minutos e, finalmente, 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C para posterior uso.

4.2.6 Análise de Expressão Gênica por RT-qPCR

A quantificação da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando o termociclador QIAquant 96 5plex (Qiagen®) e o protocolo com o agente intercalante do DNA "Sybr Green". A quantificação relativa da expressão foi calculada pelo método delta-delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$), onde a expressão relativa dos genes-alvo foi determinada pelas seguintes fórmulas:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{gene de referência})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{amostra calibradora})$$

A expressão dos genes-alvo em relação à amostra calibradora foi calculada utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Foram construídas curvas-padrão para todos os genes-alvo (CD39, CD73 e P2X7), bem como para o gene de referência (ACTB - beta actina), para a avaliação da eficiência das reações, fator essencial para a utilização do método $\Delta\Delta Ct$. As reações foram realizadas em volumes de 10 µL, contendo 2 µL de cDNA (40 ng), 20 µM dos primers forward e reverse, e 5 µL de Sybr Green (Applied Biosystems®). As reações foram realizadas em triplicatas. Após a realização das

análises das temperaturas de dissociação dos genes, comparou-se a expressão dos genes alvos entre os grupos.

4.2.7 Expressão proteica por citometria de fluxo

Para avaliação da expressão da ectonucleotidase CD39 utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-humano conjugado com o fluoróforo CD39-PE (Clone TU66, catálogo 555465, BD Bioscience). A técnica de marcação utilizou 100 µL de células mononucleares do sangue periférico/linfócitos extraídos conforme técnica padronizada e 5 µL de anticorpo conforme protocolo do fabricante, as amostras foram incubadas por 30 minutos e posteriormente lavadas com solução salina para realização da leitura. Após a marcação, as células foram capturadas (10.000 eventos) usando citômetro de fluxo BD AccuriTMC6 Plus (San Diego, CA, EUA). A mesma técnica será empregada para a expressão da ectonucleotidase CD73. Os dados foram obtidos pela leitura dos eventos avaliando os parâmetros de tamanho da célula (FSC, do inglês Forward Scatter), granulosidade (SSC, do inglês Side Scatter) e intensidade de fluorescência no respectivo canal de leitura, e posteriormente comparados com um controle não marcado. Ao final, os resultados foram expressos em percentual de células marcadas em relação ao controle e analisados estatisticamente para obtenção da expressão da ectonucleotidase.

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism 8.0.1* (GraphPad Software, San Diego, California, USA). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, os quais apresentaram distribuição normal. Os *outliers* foram analisados pelo próprio *software* e removidos apenas para a análise das variáveis que se diferenciavam dos demais dados. Sobre as variáveis do estudo, as diferenças entre pacientes com CPA e indivíduos controle foram avaliadas pelo teste t de Student para dados paramétricos, e pelo teste de Mann-Whitney para dados não

paramétrico. As análises de correlação foram avaliadas pelo teste de Pearson para dados paramétricos, e Spearman para dados não paramétricos. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou mediana e intervalo de confiança a 95% para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

A Tabela 1 descreve as características gerais da população do estudo, incluindo idade, estado civil, histórico de tabagismo, diagnóstico de COVID-19, comorbidades e histórico familiar de CPa. A média de idade dos pacientes com CPa foi de 66 anos, sendo 74,3% casados e 82,1% não fumantes. Além disso, 87,2% dos pacientes com CPa não tinham diagnóstico de COVID-19, 61,5% não apresentavam diabetes mellitus (DM) ou hipertensão (HAS) e 84,6% não tinham história familiar de CPa em parentes de primeiro grau.

Tabela 1 – Caracterização da amostra.

CARACTERÍSTICAS Tamanho amostral	Grupo CPa 39	Grupo controle 37	Valor de p
Idade	66 ± 6,72	65,81 ± 10,30	0,8503
Estado Civil	N (%)	N (%)	
Solteiro	6 (15.4%)	4 (10.8%)	-
Casado	29 (74.3%)	29 (78.4%)	
Divorciado	2 (5.1%)	1 (2.7%)	
Viúvo	2 (5.1%)	3 (8.1%)	
Hábito Tabagista	N (%)	N (%)	
Sim	7 (17.9%)	2 (5.4%)	-
Não	32 (82.1%)	35 (94.6%)	
Diagnóstico de COVID-19	N (%)	N (%)	
Sim	5 (12.8%)	4 (10.8%)	-
Não	34 (87.2%)	33 (89.2%)	
Comorbidades	N (%)	N (%)	
Sem DM + HAS	24 (61.5%)	22 (59.5%)	-
DM	0 (0%)	0 (0%)	
HAS	11 (28.2%)	13 (35.1%)	
DM + HAS	4 (10.3%)	2 (5.4%)	
CPa na Família	N (%)	N (%)	
Sim	6 (15.4%)	1 (2.7%)	-
Não	33 (84.6%)	36 (97.3%)	

Legenda: CaP, câncer de próstata; N, tamanho amostral; DM, diabetes mellitus; HAS, hipertensão arterial sistêmica.

Os dados da expressão gênica de P2X7, CD39 e CD73 nos grupos CPa e controle estão apresentados na Figura 1. A expressão dos três genes foi significativamente maior no grupo CPa em relação ao grupo controle.

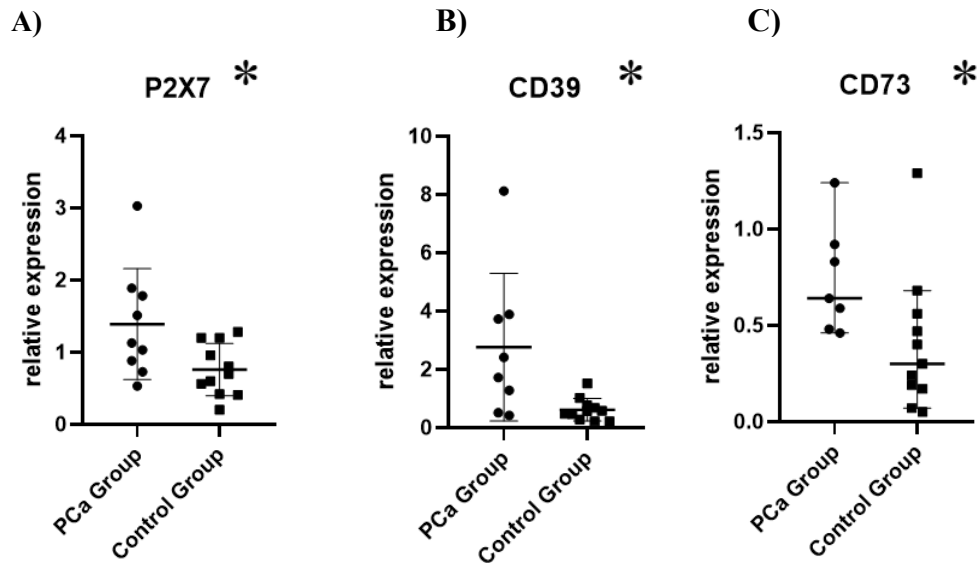


Figura 1 - Expressão gênica de P2X7, CD39 e CD73 em linfócitos do grupo CaP e grupo controle. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p \leq 0,00005$. A) Expressão do gene P2X7R. Grupo CaP $1,3690 \pm 0,7696$ ($n=9$), Grupo Controle $0,7573 \pm 0,3633$ ($n=11$); * $p < 0,0260$. B) Expressão do gene CD39. Grupo CaP $2,760 \pm 2,532$ ($n=8$), Grupo Controle $0,6164 \pm 0,3862$ ($n=11$); * $p < 0,0125$. C) Expressão do gene CD73. Grupo CaP $0,7371 \pm 0,2796$ ($n=7$), Grupo Controle $0,4018 \pm 0,3557$ ($n=11$); * $p < 0,0268$.

Os dados de correlação da expressão entre os genes P2X7, CD39 e CD73 nos grupos CPa e controle estão apresentados nas Figuras 2, 3 e 4. Observou-se correlação positiva entre a expressão dos genes P2X7 e CD39 no grupo controle.

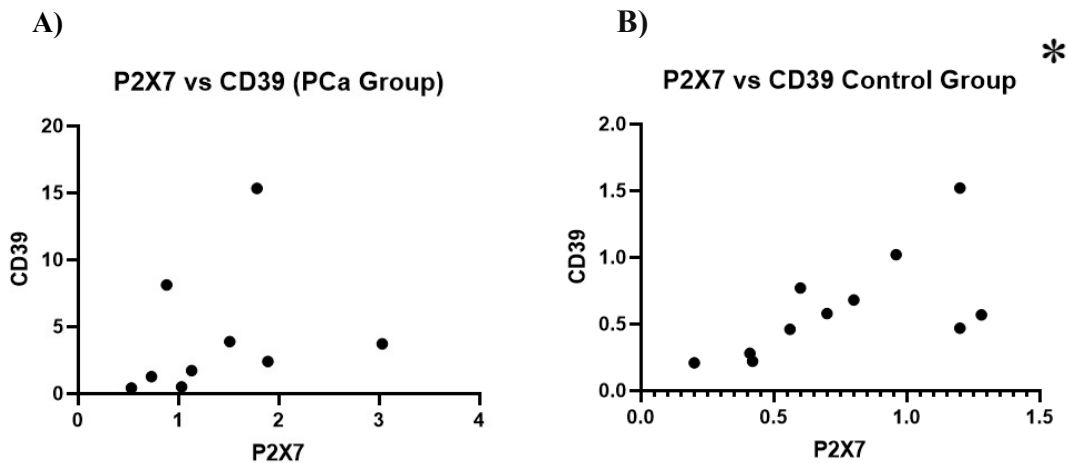


Figura 2 - Correlação entre a expressão gênica de P2X7 e CD39 em linfócitos do grupo CaP e grupo controle. Os resultados foram expressos como o valor de r . * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p \leq 0,00005$. A) P2X7 vs. CD39 (CaP); $r = 0,5500$, $p < 0,1328$. B) P2X7 vs. CD39 (Grupo Controle); $r = 0,6743$, * $p < 0,0266$.

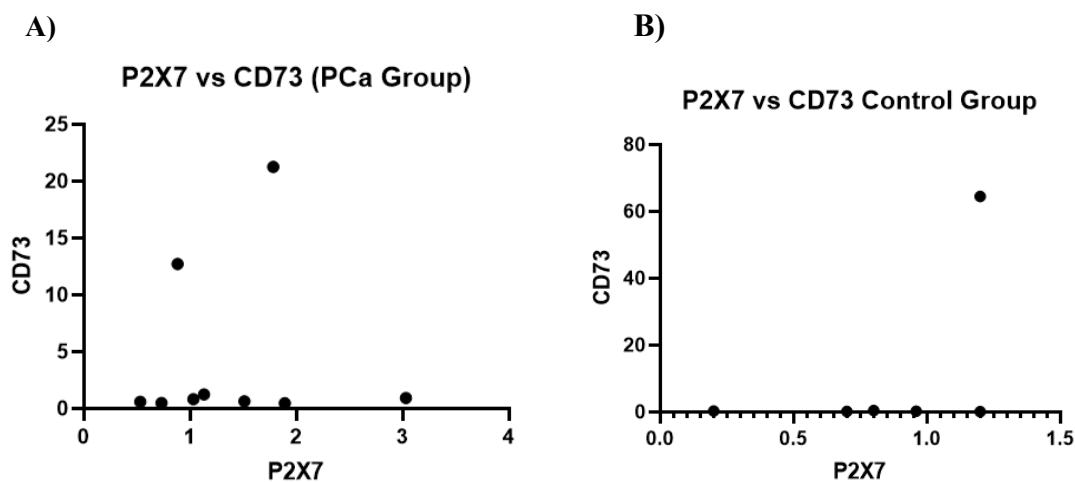


Figura 3 - Correlação entre a expressão gênica de P2X7 e CD73 em linfócitos do grupo CaP e grupo controle. Os resultados foram expressos como o valor de r . * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p \leq 0,00005$. A) P2X7 vs. CD73 (CaP); $r = 0,1667$, $p < 0,6777$. B) P2X7 vs. CD73 (Grupo Controle); $r = 0,0000$, $p > 0,9999$.

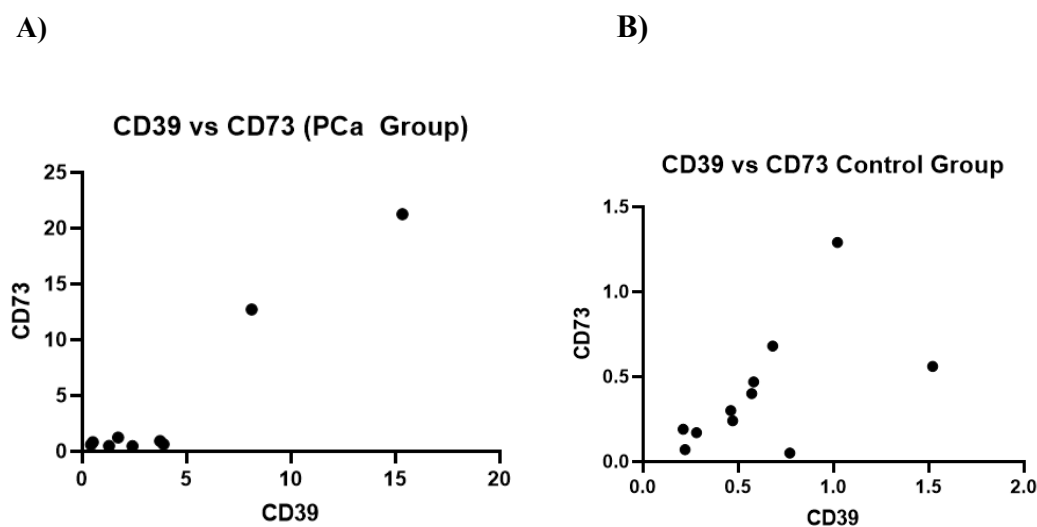


Figura 4 - Correlação entre a expressão gênica de CD39 e CD73 em linfócitos do grupo CaP e grupo controle. Os resultados foram expressos como o valor de r . * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p \leq 0,00005$. A) CD39 vs. CD73 (CaP); $r = 0,6000$, $p < 0,0968$. B) P2X7 vs. CD73 (Grupo Controle); $r = 0,6000$, $p > 0,0562$.

Os dados da expressão proteica de CD39, e da correlação entre a expressão gênica e proteica de CD39 nos grupos CPa e controle estão apresentados na Figura 5.

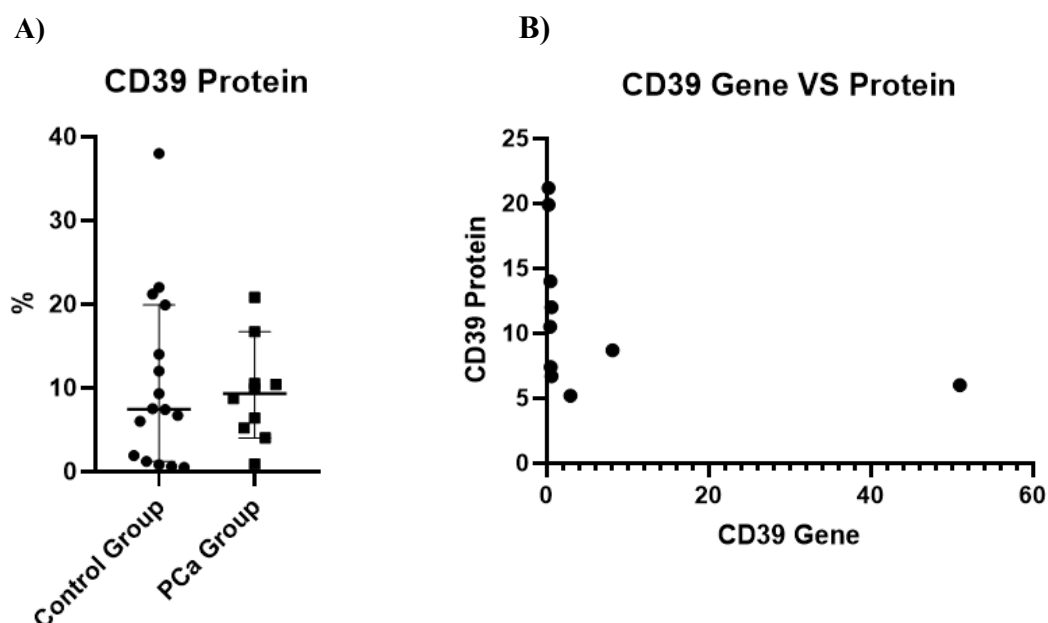


Figura 5 - Expressão da gênica e proteica de CD39. Os resultados foram expressos como mediana e IC 95% para a proteína CD39 (n=16 grupo controle, n=10 grupo CaP) e r (n = 10) para o gene CD39 vs. proteína, considerando os grupos CaP e grupo Controle em conjunto. *p < 0,05, **p < 0,005, ****p ≤ 0,00005. A) Expressão proteica de CD39. Grupo Controle 7,450%, 1,200 a 19,90; Grupo CaP 9,300%, 4,000 a 16,70. b) Gene CD39 vs. proteína. r = -0,3710, p > 0,2912.

6 DISCUSSÃO

O CPa continua sendo um grande desafio global de saúde, sendo o segundo câncer mais diagnosticado em homens e uma das principais causas de mortes relacionadas ao câncer. Fatores genéticos desempenham um papel essencial, com aproximadamente 5-15% dos casos de CPa atribuídos à hereditariedade. Em nosso estudo, apenas 15,4% dos pacientes tinham histórico familiar de PCa, enquanto a média de idade era de 66 anos, consistente com estudos anteriores que mostram maior incidência em homens na sexta década de vida. A maioria dos pacientes (74,3%) eram casados, um fator associado a menor risco de mortalidade em comparação com pacientes solteiros, divorciados ou viúvos. Além disso, 17,9% dos pacientes eram fumantes, um fator de risco que, juntamente com o consumo de álcool e obesidade, está associado ao aumento do risco e da progressão do CPa (Sharma; Miyamoto, 2018; Costello, 2020; Gandaglia *et al.*, 2021; Shukla *et al.*, 2020).

No nível celular, alterações no sistema de sinalização purinérgica desempenham um papel fundamental na progressão e no manejo do CPa. Dados prévios do grupo de pesquisa com o mesmo grupo amostral mostraram que a enzima CD39 exibiu aumento na hidrólise de ATP e redução na hidrólise de ADP nos pacientes com CaP, levando a uma maior disponibilidade de ATP extracelular, o que promoveu um ambiente pró-inflamatório, criando respostas imunes que podem contribuir tanto para a progressão do tumor em fatores como angiogênese, tanto quanto para as respostas imunes, favorecendo a morte das células tumorais. Por outro lado, a atividade da ADA foi reduzida, causando um acúmulo de ADO, molécula ligada principalmente à imunossupressão e ao desenvolvimento do câncer (Borth, 2023). Esses dados foram consistentes com pesquisas prévias que documentaram alterações semelhantes no sistema purinérgico em diversos tipos de câncer (Di Virgilio; Adinolfi, 2017; Di Virgilio *et al.*, 2016).

Os dados obtidos nessa pesquisa mostraram um aumento na expressão gênica do receptor P2X7 no grupo de CaP, indicando que o ambiente pró-inflamatório no câncer altera o microambiente tumoral, o que pode desencadear a atividade de outras vias de sinalização, como a do inflamassoma NLRP3. Essa resposta pode promover tanto mecanismos anti-tumorais, incluindo a morte celular tumoral por apoptose ou piroptose, ou ainda levar a uma sinalização descontrolada de fatores como o VEGF e

HIF-1, que favorecem a progressão tumoral (Di Virgilio; Adinolfi, 2017; Di Virgilio *et al.*, 2016).

Além da expressão gênica aumentada do receptor P2X7 no grupo de pacientes, observamos de forma semelhante o aumento da expressão gênica das enzimas CD39 e CD73, o que demonstra a importância da cascata de sinalização purinérgica derivada do processo tumoral na próstata, impactando o microambiente tumoral.

Ao realizarmos a correlação entre o receptor P2X7 e as enzimas CD39 e CD73, bem como entre as enzimas, não observamos resultados significativos, com exceção da correlação entre P2X7 e CD39 no grupo controle. A expressão proteica por citometria de fluxo da CD39 nos linfócitos do grupo CaP e do grupo controle não mostrou significância, assim como a correlação entre a expressão gênica e proteica da mesma.

Os dados demonstram que não há uma relação direta entre estes marcadores, sendo uma hipótese as mudanças bioquímicas ocorridas na mitocôndria e o desvio de fluídos com Ca^{2+} e K^{+} pela abertura de canais iônicos que ativam o P2X7, gerando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, desviando o fluxo de moléculas para outros componentes e vias de sinalização (Rossetto *et al.*, 2025).

Outras vias de sinalização relacionadas, como a MAPK, regulam esses fatores de transcrição citados acima, como o VEGF, e podem contribuir com a progressão e invasão tumoral, a angiogênese, e ativação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1B, por meio da ativação do inflamassoma NLRP3. Além disso, o aumento da produção de EROS, impulsionado pela NADPH oxidase e pelas alterações na função mitocondrial, leva ao estresse oxidativo, que desempenha um papel crucial na progressão do câncer, através de mudanças no mtDNA (Di Virgilio; Adinolfi, 2017).

O papel dual derivado da resposta do P2X7 na regulação da inflamação e das respostas imunes sugere que ele pode ser um alvo terapêutico valioso. A modulação desse receptor pode fazer parte de uma estratégia para melhorar a capacidade do sistema imunológico de combater o câncer ou suprimir vias pró-tumorais. A combinação de inibidores de P2X7 com imunoterapias existentes, pode potencialmente melhorar os resultados do tratamento, reduzindo a resistência a quimioterapia, controlando o microambiente tumoral e promovendo uma melhor resposta anticâncer (Sharma; Miyamoto, 2018).

O equilíbrio dinâmico entre a inflamação induzida pelo ATP extracelular ao ativar o receptor P2X7 e a imunossupressão mediada pela ADO molda o microambiente tumoral. O aumento de ADO, devido à atividade da CD73, favorece a

imunossupressão mas é capaz de reduzir os danos oxidativos causados pelas ROS, assim, a presença de ADO na maioria dos casos, suprime a capacidade do sistema imune de combater as células tumorais. Um ambiente imunossupressor, embora em termos possa combater espécies reativas, também pode suprimir o sistema imune mediante ao combate tumoral (Shukla *et al.*, 2020).

Diante dos dados, a interação entre a inflamação e a imunossupressão no microambiente tumoral mediada pela sinalização purinérgica, emerge como um fator crucial na determinação da trajetória da progressão do CaP. Pesquisas futuras devem se concentrar em estratégias terapêuticas que visem o sistema purinérgico, buscando ajustar esse equilíbrio. Isso deve envolver a modulação de componentes específicos, como o P2X7, para um manejo adequado frente aos processos inflamatórios excessivos, ou também a modulação das enzimas CD39 e CD73 no que diz respeito aos aspectos imunossupressores envolvidos no microambiente tumoral.

O direcionamento destes sistemas pode melhorar a eficácia de tratamentos tradicionais, como a prostatectomia radical e tratamentos quimio e radioterápicos, ao criar condições mais favoráveis à detenção da progressão e desenvolvimento tumoral. As abordagens integradas visando a manipulação das vias purinérgicas, juntamente com o controle de vias relacionadas, pode não só desacelerar a progressão, mas também potencialmente reverter parte dos danos celulares e estresse fisiológico, ampliando os horizontes para o manejo da doença, contribuindo com a comunidade científica, e possibilitando novos manejos clínicos e humanização do tratamento de pacientes com CPa.

7 CONCLUSÃO

Os dados mostraram o aumento da expressão a nível gênico dos receptores e enzimas do sistema purinérgico nos pacientes com CaP, demonstrando a importância da cascata de sinalização purinérgica derivada do processo tumoral na próstata, impactando no padrão pró-inflamatório e imunossupressor do microambiente tumoral. Uma limitação do estudo foi o número amostral reduzido em algumas das análises realizadas, o que pode ter definido a ausência de significância, principalmente nas correlações. Como perspectivas futuras, explorar as vias de sinalização purinérgica integrando moduladores com terapias existentes, como imunoterapias, pode ser uma boa estratégia, assim como terapias envolvendo biomarcadores relacionados a vias de sinalização sinérgicas ao sistema purinérgico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARD, V et al 2021 Localized and locally advanced prostate cancer treatment options *Mar Oncology* 99 7 413–421 Mar

ADINOLFI E CAPECE M AMOROSO F DE MARCHI E FRANCESCHINI A 2015 Emerging roles of P2X receptors in cancer *Curr Med Chem* 22 7 878–890

ALLARD D TURCOTTE M AND STAGG J 2017 Targeting A2 adenosine receptors in cancer *Immunol Cell Biol* 95 333–339 <https://doi.org/10.1038/icb.2017.8>

ALLARD B ALLARD D BUISSET L STAGG J 2020 The adenosine pathway in immuno-oncology *Nat Rev Clin Oncol* 17 10 611–629 doi 10.1038/s41571-020-0382-2 Epub 2020 Jun 8 Erratum in *Nat Rev Clin Oncol* 2020 Oct 17 10650 doi 10.1038/s41571-020-0415-x PMID 32514148

ALLARD D CHROBAK P ALLARD B MESSAOUDI N STAGG J 2019 Targeting the CD73 adenosine axis in immuno-oncology *Immunol Lett* 205 31–39

AMOROSO F et al 2015 Emerging roles of P2X receptors in cancer *Curr Med Chem* 22 7 878–890 Balvan Jan et al 2015 Oxidative stress resistance in metastatic prostate cancer renewal by self-eating Dec *PLOS ONE* 10 12 e0145016 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145016>

BAGHBANI E NOOROLYAI S SHANEHBANDI D MOKHTARZADEH A AGHEBATI-MALEKI L SHAHGOLI VK BRUNETTI O RAHMANI S SHADBAD MA BAGHBANZADEH A SILVESTRIS N BARADARAN B 2021 Regulation of immune responses through CD39 and CD73 in cancer Novel checkpoints *Life Sci* 282 119826 doi 10.1016/j.lfs.2021.119826 Epub 2021 Jul 12 PMID 34265363

BEKELMAN JE et al 2018 Clinically Localized Prostate Cancer ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of an American Urological Association American Society for Radiation Oncology Society of Urologic Oncology Guideline *Sept J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* Sept

BOERRIGTER E et al 2020 Clinical utility of emerging biomarkers in prostate cancer liquid biopsies *Feb Expert Rev Mol Diagn* 20 2 219–230 Feb Borth 2023

BURNSTOCK G KNIGHT GE 2004 Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems *Int Rev Cytol* 240 31–304 doi 10.1016/S0074-7696(04)40002-3 PMID 15548415

BURNSTOCK G AND VERKHRATSKY A 2012 Purinergic signaling *WIREs Membr Transp Signal* 1 116–125 <https://doi.org/10.1002/wmts.14>

BURNSTOCK G DI VIRGILIO F 2013 Purinergic signaling and cancer *Purinergic Signal* 9 4 491–540

CHEN Q et al 2020 CD73 Acts as a Prognostic Biomarker and Promotes Progression and Immune Escape in Pancreatic Cancer *J Cell Mol Med* 24 15 8674–8686

CHOW A, PERICA K, KLEBANOFF CA, WOLCHOK JD. Clinical implications of T cell exhaustion for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Dec;19(12):775-790. doi: 10.1038/s41571-022-00689-z. Epub 2022 Oct 10. PMID: 36216928; PMCID: PMC10984554.

CIRNE, F, *et al*. Modifiable Risk Factors for Prostate Cancer in Low- and Lower-Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Prostate Cancer Prostatic Diseases**, vol. 25, no. 3, pp. 453-462, Sep. 2022.

COSTELLO, A, J. Considering the Role of Radical Prostatectomy in 21st Century Prostate Cancer Care. **Nature Reviews Urology**, vol. 17, no. 3, pp. 177-188, Mar. 2020.

DI VIRGILIO, F., et al., 2016. P2 Receptors in cancer progression and metastatic spreading (Aug). *Curr. Opin. Pharmacol.* 29, 17–25 (Aug)

DI VIRGILIO, F., ADINOLFI, E., 2017. Extracellular purines, purinergic receptors, and tumor growth. *Oncogene* 36, 1–11.

DI VIRGILIO, F., SARTI, A., COUTINHO-SILVA, C., 2020. R. purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 318 (5), C832–C835.

DI VIRGILIO, F., VUERICH, M., 2015. Purinergic signaling in the immune system. *Auton. Neurosci.: Basic Clin.* 191, 117–123.

DI VIRGILIO, F; ADINOLFI, E. Extracellular Purines, Purinergic Receptors and Tumor Growth. **Oncogene**, vol. 36, pp. 1-11, 2017.

EGEVAD, L. *et al*. Evolution, Controversies and the Future of Prostate Cancer Grading. **Pathology International**, vol. 69, no. 2, pp. 55-66, Feb. 2019.

GANDAGLIA, G. *et al*. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. **European Urology Oncology**, vol. 4, no. 6, pp. 877-892, Dec. 2021.

GARDANI, C.F.F., et al., Mar. 2019. Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in the blood plasma of prostate cancer patients. *Purinergic Signal.* 15 (1), 95–105.

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.).

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, IARC – Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2023, males, all ages.

LEAL, D.B., et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ectodiphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1721, p.9-15, 2005.

LERTSUWAN et al., Purinergic Receptor Expression and Cellular Responses to

Purinergic Agonists in Human Prostate Cancer Cells, vol 37, 10.21873/anticancerres.11345, Anticancer Research

LIU, M. *et al.* Evaluation of Adenosine Deaminase Activity and Its Isoenzymes in Pleural Effusions: Diagnostic and Clinical Implications. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, vol. 24, pp. 288-294, 2022.

MOESTA, A.K., LI, X.Y., SMYTH, M.J., 2020. Targeting CD39 in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 739–755.

PENAR, C, H. *et al.* The epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v.8 n. 12, dec, 2018.

PEREIRA, K, G. *et al.* Factors associated with masculinity in the early diagnosis of prostate cancer: a narrative review, *Revista Nursing*, v. 24, n. 277, p. 5811-5818, june, 2021.

QIAO, C. *et al.* ATP-gated P2X7 receptor as a potential target for prostate câncer. **Human Cell**, v. 35, n. 5, p. 1346-1354, set. 2022.

SHARMA, M; MIYAMOTO, H, Percent Gleason pattern 4 in stratifying the prognosis of patients with intermediate-risk prostate cancer. *Translational Andrology and Urology*, v. 7, n.5, p. 484-489, sep. 2018.

SHUKLA, S. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Status in High-Risk Prostate Cancer Subjects, *Diagnostics*, v. 10, n.3, p. 126, feb. 2020.

TAFANI, M., *et al.*, 2011. Hypoxia-increased RAGE and P2X7R expression regulates tumor cell invasion through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF- κ B. *Carcinog* 32 (8), 1167–1175.

VAGHARI-BAGARI, M, *et al.* Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 8, p. 5512-5532, aug. 2021.

VIETRI, M, T. *et al.* Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n.7, p. 3753, apr. 2021

WANG, J., DU, L., CHEN, X., 2022. Adenosine signaling: Optimal target for gastric cancer immunotherapy. *Front. immunol.* 16 (13).

XIA, Y., ZHAO, D., LIU, T., CHEN, Z., LIU, Y., LI, W., 2022. The role of oxidative stress in prostate cancer: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* v. 2022, 1–15.

ANEXO 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, câncer colorretal e câncer de bexiga.

2. Critérios 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), câncer colorretal (do tipo adenocarcinoma) e câncer de bexiga, 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 explicado 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

Contato profissional com o(a) pesquisador(a) responsável: Tel: 49-30254508/ e-mail: sarah.maciel@uffs.edu.br. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS: Tel e Fax - 49- 2049-3745/ e-mail: cep.uffs@uffs.edu.br.

Endereço para correspondência: Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, Universidade Federal da Fronteira Sul, Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, CEP 89815- 899, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo

em participar. Nome completo do participante e contato:

Assinatura:

ANEXO 2

Critical Reviews in Oncology / Hematology 209 (2025) 104675



Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc

Relationship between purinergic signalling and oxidative stress in prostate cancer: Perspectives for future therapy

Rafael Zatti Rossetto¹, Sarah Franco Vieira De Oliveira Maciel², Andréia Machado Cardoso^{*,3,4}

Graduate Program of Biomedical Sciences, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Prostate cancer
Purinergic signaling
Reactive oxygen species (ROS)
Tumor microenvironment (TME)
Adenosine triphosphate (ATP)
Immune evasion

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is a complex and lethal disease in men, influenced by risk factors such as age, heredity, and lifestyle. This article reviews the roles of purinergic signaling and reactive species in PCa progression. The purinergic system involves signaling molecules, such as ATP and adenosine, specific receptors (P1 and P2), and catalytic enzymes (for example, CD39 and CD73), whose alterations contribute to cell proliferation, angiogenesis, and immune evasion. The purinergic receptors P2X7 and P2X4 modulate the prostate tumor microenvironment (TME), impacting hypoxia, apoptosis, and inflammatory pathways. Reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) also play crucial roles. At elevated levels, they lead to oxidative damage to DNA and mitochondria, promoting genetic instability and uncontrolled cell proliferation. These species interact with the purinergic signaling pathway, with enzymes like CD39 and CD73 playing dual roles: degrading extracellular ATP to generate immunosuppressive adenosine while simultaneously protecting against oxidative damage. This review emphasizes the dynamic interplay between inflammatory and immunosuppressive signals within the TME, mediated by ATP, ROS, and their signaling cascades. This balance determines whether the environment supports tumor progression or regression. Targeting these mechanisms through innovative therapies, including receptor inhibitors and ROS modulation, presents promising avenues for PCa treatment. Understanding the intricate roles of purinergic signaling and reactive species provides valuable insights into potential therapeutic strategies to combat PCa.

1. Introduction

Prostate Cancer (PCa) primarily affects middle-aged men, typically between the ages of 45 and 60, and currently holds the highest mortality rate among male cancers. The diagnosis of this cancer involves a series of tests, including prostate-specific antigen (PSA) measurement, digital rectal examination, prostate biopsy, magnetic resonance imaging, and other screening methods, such as the Gleason score, which delineates characteristics in the tumor phenotype. Additionally, several risk factors contribute to the heterogeneous condition of PCa, including aging, metabolic syndrome, hereditary, and lifestyle-related influences (Achard et al., 2021; Boerrigter et al., 2020).

The pathophysiology of PCa is directly and closely linked to the systems discussed in this review, particularly purinergic signaling and

its components, and the modulation of reactive species predominant in PCa for tumor onset and progression. These mechanisms primarily affect the cell cycle, leading to significant changes in cellular autophagy and tumor survival, as well as other derived responses in lateral signaling pathways involving secondary mechanisms, as described later in this study (Wang et al., 2022).

In PCa scenario, changes occur in the tumor microenvironment (TME), including continuous inflammatory processes, survival of cancer cells in hypoxia, supportive immune responses and production of reactive oxygen species (ROS) involved with P2X7, with superoxide and hydrogen peroxide being the most common ROS in PCa, as well as the production of reactive nitrogen species (RNS), with nitric oxide and its derivatives, such as nitrite and nitrate, being more prevalent in this environment (Khandrika et al., 2009).

* Correspondence to: Federal University of Fronteira Sul, Campus Chapecó, Chapeco City, Chapeco City, SC, Brazil.

E-mail address: andrea.cardoso@uffs.edu.br (A.M. Cardoso).

¹ Orcid: 0009-0007-5265-8276

² Orcid: 0000-0002-5746-7109

³ Orcid: 0000-0003-4243-8855

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-4243-8855>

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104675>

Received 6 January 2025; Received in revised form 19 February 2025; Accepted 21 February 2025

Available online 25 February 2025

1040-8428/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Furthermore, changes involving purinergic signaling are also found in changes concerning the cell cycle, such as cell proliferation, changes in apoptosis, angiogenesis, and hypoxia, among others. The production of extracellular adenosine triphosphate (ATP) and of adenosine (ADO), as well as their respective receptors [(P1 for ADO and P2 for ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP)] and enzymes that catalyze these nucleotides, such as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73), also present significant alterations in their activity and/or expression in PCa (Di Virgilio, 2009).

In this context, studying the involvement of these systems in PCa progression becomes essential, as the development of new therapeutic approaches, such as novel combinations of inhibitors or agonists of purinergic receptors and enzymes, synergist with the existent therapies and genome editing are emerging in a crucial way to the near future.

Thus, the objective of this review is to elucidate the mechanisms that both purinergic signaling and ROS could impact in the process of PCa development, and progression and also understand how our biological system can fight against this disease, leading cancer cells to death.

Understanding signal-regulated pathways is crucial because of their direct relationship with inflammation in various contexts. Inflammation is one of the hallmarks of cancer, and this understanding could help identify an inflammatory profile of markers and predictors that correlate with better or worse prognoses, especially in light of novel therapies. Several studies have indicated that inflammation plays a significant role in the development of prostate cancer; however, the connection between the pathways highlighted in this systematic review is quite novel.

This review represents a significant advance in Pca research, as it establishes, for the first time, the direct connection between the purinergic system and oxidative stress in this context. While previous studies have explored the role of the purinergic system and oxidative stress in PCa in isolation, this review integrates the two areas, opening new perspectives for the development of innovative therapies.

The absence of previous work investigating the combined modulation or inhibition of these systems in the treatment of PCa highlights the

originality and relevance of this research. Unlike previous studies that focused on the interaction of existing therapies, such as chemotherapy, with immunotherapy, this review focuses on the fundamental relationship between purinergic signaling and oxidative stress, offering a new paradigm for understanding and treating prostate cancer.

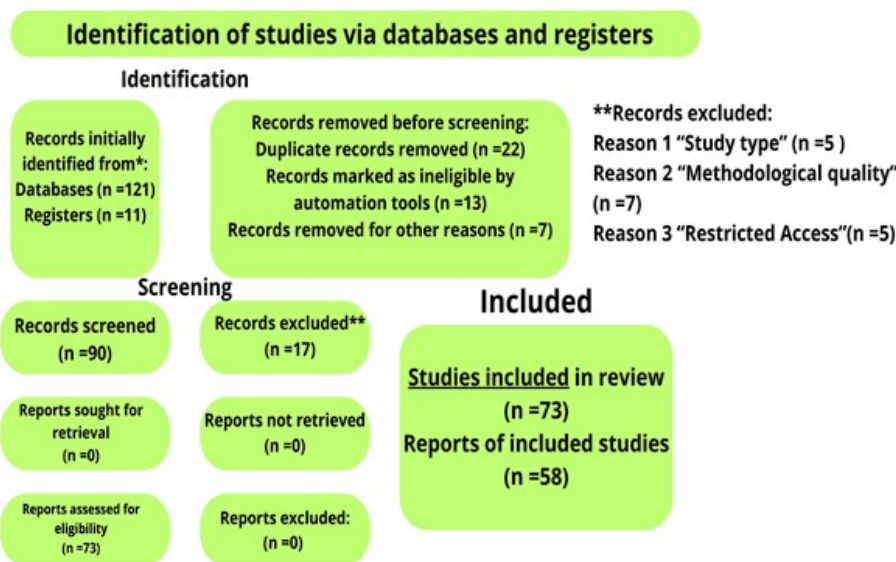
2. Methods

To gather relevant literature on the interplay between purinergic signaling and oxidative stress in PCa, a selection of comprehensive databases was utilized, including PubMed, Scopus, and Web of Science. A search strategy was defined, incorporating keywords such as "purinergic signaling," "oxidative stress," and "prostate cancer," along with Boolean operators to refine the search results.

Inclusion and exclusion criteria were established to filter articles effectively. The focus was on peer-reviewed articles that specifically addressed the relationship between purinergic signaling and oxidative stress in PCa, encompassing both clinical and preclinical studies. Articles not directly related to PCa, such as reviews and opinion pieces, were excluded.

The screening process began with an initial review of titles and abstracts to identify potentially relevant articles, followed by the retrieval of full-text articles that met the inclusion criteria for a more thorough evaluation. Data extraction involved systematically collecting relevant information, including study design and key findings, while a quality assessment of the included studies was conducted using appropriate tools.

The synthesized findings were then summarized to highlight key themes, mechanisms, and potential therapeutic targets, providing a comprehensive overview of the current understanding of the relationship between purinergic signaling and oxidative stress in PCa. This synthesis also identified gaps in knowledge and areas for future research. Throughout the review process, adherence to PRISMA guidelines ensured transparent and comprehensive reporting, contributing valuable insights to the field of PCa research.



3. Purinergic signaling and PCA

The purinergic system comprises signaling molecules, nucleotide-converting enzymes and nucleosides, and a set of 19 specific receptors for this system. Among these signaling molecules, ATP, ADP, and adenosine stand out, but, the impact of AMP remains critical in the enzyme's roles (Burnstock and Di Virgilio, 2013).

Regarding the enzymes catalyzing these degradation processes, the family of ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolases (ENTPDase), more commonly expressed in cancer processes in its subtype 1, also known as CD39, is notable. This enzyme degrades ATP into ADP, and ADP into AMP. Another enzyme related to the degradation of these molecules is ecto-5'-nucleotidase, or CD73, which converts AMP into ADO (Di Virgilio and Adinolfi, 2015).

For the degradation of ADO, the enzyme adenosine deaminase (ADA) plays an important role in the context of PCA, converting it into inosine. These enzymes form the enzymatic compounds of purinergic signaling most related to cancer processes, being the most important and also the most studied in terms of their activity or expression (Burnstock and Di Virgilio, 2013).

About the purinergic receptors, the P1 family corresponds to ADO binding receptors (A2, A2A, A2B, and A3), and the P2 family corresponds to ATP, ADP, and AMP binding receptors (7 subtypes of P2X, and 8 subtypes of P2Y receptors). The events associated with tumor cell proliferation stages generate an inflammatory microenvironment without reaching the resolution stage, favoring the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs), as this process occurs dynamically between proliferation and cell injury or destruction (Di Virgilio et al., 2020).

One of these mechanisms associated with a DAMP corresponds to ATP, which has a crucial role in pro-inflammatory activation, and also the immune response through DAMP, and ADO, which seems to have an anti-inflammatory role more prevalent in this scenario, making it a vital component in purinergic signaling related to cancer processes, especially in the progression, survival, invasion and development of PCA (Di Virgilio et al., 2016; Burnstock, Di Virgilio, 2013).

These signaling molecules generally respond to several processes such as stimulation or inhibition of cell apoptosis, cell proliferation, as well as cell differentiation, tumor angiogenesis, hypoxia-activated signaling pathways (HIF-1), changes in bioenergetics and mitochondrial DNA (mtDNA), and activation of growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), as well as other factors and signaling pathways that similarly relate to the purinergic signaling (Bekelman et al., 2018; Chen et al., 2020).

ATP is closely related to this increased bioenergetics metabolism, including gene changes. It is known that the failure to interrupt cell cycle by tumor suppressor genes (TSG), such as the TP53 gene, can result in pronounced cell proliferation, with ATP being one of the markers at elevated levels in this context, in response to the cell cycle dysfunction, leading to the activation of purinergic signaling enzymes and their specific P2 family receptors (Di Virgilio and Purines, 2012; Rathbone et al., 1992).

For instance, the nucleoside ADO is found at elevated levels in cancer development, as its anti-inflammatory function attempts to interrupt molecular damage. However, it can induce tumor growth under exacerbated levels, as it is associated with inducing angiogenesis and the immunosuppressive state of the TME, thereby also activating receptors and enzymes to degrade it (Deaglio and Robson, 2011; Spychala, 2000).

Exploring additional pathways beyond the commonly studied ones associated with the imbalance of P2 purinergic receptors, for example, has contributed to obtaining new perspectives on disease processes and therapeutic targeting. Thus, these receptors stand out as biomarkers and important therapeutic targets for managing PCA, such as pain management and the inflammatory profile of these individuals (Camici et al.,

2019; He et al., 2020).

3.1. The role of P2 receptors in PCA

Among the P2X receptors, changes in the expression of these ion channel receptors and their tumor activity modulate the proliferation and apoptosis of tumor cells. Tumor angiogenesis is influenced mainly by potassium (K⁺) and calcium (Ca²⁺) ion channels, while tumor invasion and metastasis are affected by sodium (Na⁺) and chloride (Cl⁻) ion channels. Additionally, G protein-coupled receptors (P2Y) play a role in metastatic cancer progression and are promising targets for therapeutic modalities in cancer management (Wang et al., 2022).

P2 receptors, in general, have an ambiguous vital and critical role in the TME, where their activation or inhibition can induce cancer cell death, which is beneficial, or on the other hand, continue to promote disordered cell growth depending on the stage of PCA. Furthermore, stimulation of these receptors often triggers an inflammatory response, contributing to the activation of the immune system, but alternatively activating immunosuppressive mechanisms within the TME. Activation of these receptors can stimulate cell proliferation through extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Tafari et al., 2011).

Beyond this context, studies have demonstrated that the P2X7 receptor is present in PCA and is especially essential for tumor growth and for the aggressive phenotype, leading to the activation of other signaling pathways. It is expressed at various stages of PCA, including localized cancer, metastatic cancer, and those resistant to tumor resection, as well as those resistant to androgen deprivation therapies (Adinolfi et al., 2015).

In addition to P2X7, studies suggest that the P2X4 receptor also plays a fundamental role in the development of PCA, being related to angiogenesis, activation of growth factors, inhibition of tumor apoptosis, and others. Therapeutic processes inhibiting these receptors are already being studied, and hold a promising future concerning the suppression of PCA progression (Burnstock, 2002; Kunzli et al., 2011).

Studies show that hypotonic stress, when a healthy cell is exposed to a lower solute concentration than its interior, can initiate a cell proliferation cycle driven by feedback from ATP release and the subsequent purinergic receptors signaling, leading to elevated intracellular Ca²⁺ levels and activation of other pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), favoring continued cell cycle progression (Amoroso et al., 2015; Lertsuwan et al., 2017).

Cellular signaling cascade involving MAPK can drive PCA progression. Thus, androgen deprivation therapies and other therapies aiming to modulate this pathway are being studied as potential therapeutic interventions influencing clinical outcomes as well as pathological progression. Additionally, HIF-1 may modulate P2X7 with positive feedback, increasing its invasive characteristics and promoting angiogenesis in a hypoxic TME (Di Virgilio and Adinolfi, 2017; Burnstock, 2002).

Hypoxia activated by HIF-1 can induce the expression of P2X7, also leading to the augmentative amount of ROS. On the other hand, HIF-1 contributes to tumor invasion and metastasis by increasing the activity of other proteins, such as metalloproteinase 9 (MMP-9), responsible for degrading the extracellular matrix, promoting tumor angiogenesis, and facilitating tumor invasion and metastasis. Reduction levels of P2X7 lead to lower levels of HIF-1 and VEGF (Adinolfi, 2017; Burnstock and Di Virgilio, 2013; Di Virgilio and Vuerich, 2015).

P2X4 receptors, when activated, increase migration and invasion of PCA cells through epithelial-mesenchymal transition (EMT) mechanisms. Additionally, elevated levels of this receptor have been observed in PCA cells showing loss of proteins such as phosphatase and tensin homolog (PTEN), which acts as an inhibitor of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway, where increased expression of this receptor is associated with a higher risk of metastasis, as this protein leads to the dephosphorylation of protein kinase B (PKB/AKT) (He et al., 2020; Di Virgilio and Adinolfi, 2017).

The active form of AKT is associated with worse prognosis in various types of cancers, while increased expression of P2X4, combined with loss of PTEN, correlates with an increased risk of metastasis and recurrence of high PSA levels after prostatectomy. Studies show that inhibition of this receptor decreases cancer cell survival, potentially making it a promising target for therapeutic modalities (Burnstock, 2002; He et al., 2020).

P2Y receptors can play both functions in PCa, once P2Y1 receptor tends to inhibit cancer cell proliferation, while the P2Y2 receptor tends to promote it. Studies in cell lines have shown that activation of P2Y2 leads to phosphorylation of p38, increasing the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and resistance to apoptosis in PCa cells (Le et al., 2019; Burnstock; Di Virgilio, 2013).

3.2. The role of CD39 and CD73 in PCa

CD39, or ENTPDase1, consists of a 510 amino acids protein and contains cysteine residues and glycosylation sites. Its extracellular domain is larger and mediates the activity of this nucleotidase. Located on the cell surface, it catalyzes the hydrolysis of ATP and ADP to produce AMP. The expression of CD39 can be induced by inflammatory processes in PCa, nutritional deprivation, oxidative stress, and some transcription and growth factors (Gardani et al., 2019; Moesta et al., 2020; Liu et al., 2010).

The CD73 protein enzyme, or ecto-5'-nucleotidase, is a membrane-bound enzyme found in most tissues. It assists in the hydrolysis of AMP generated by CD39 into ADO. In particular, this enzyme is strongly associated with the generation of ADO in the TME, playing a crucial role in immunosuppression (Liu et al., 2022; Xia et al., 2022).

Extracellular ADO can be generated by passive diffusion or active transport of intracellular ADO. Alternatively, it can be generated through the hydrolysis of extracellular ATP. In solid tumors, such as PCa, ATP is released into the extracellular space due to factors like hypoxia, inflammation, nutritional deprivation, or even cellular necrosis and cytotoxic drugs, such as excessive dihydrotestosterone (DHT) (Allard et al., 2019; Burnstock and Di Virgilio, 2013).

ATP released into the extracellular space is converted into AMP by CD39 and then subsequently hydrolyzed into ADO by CD73. It is

important to note that both enzymes are highly expressed in differentiated cell types within the TME, including tumor cells, immune cells, and endothelial cells (Moesta, 2020; Di Virgilio, 2009).

Exosomes or extracellular vesicles carrying CD39 and CD73 are constantly generated in the presence of tumor cells, leading to an increase in these enzymes within the TME, which may be a mechanism leading to increased ADO levels (Chen et al., 2020; Xia et al., 2022).

Elevated levels of CD39 mRNA correlate with better long-term survival rates after tumor resection. High expression of CD39 has been observed in both primary and metastatic tumors, although it has been shown that the combination of CD39 and CD73 levels together provides better prognostic value compared to CD39 alone (Baghbani et al., 2021).

The expression of CD73 in PCa TME is associated with hypoxia induction, inadequate tissue perfusion, and activation and stabilization of hypoxia-related transcription factors, such as HIF-1. Other tumor signaling pathways, gene mutations, or loss of estrogen receptor signaling (ER α), have also been associated with increased CD73 expression (Chang et al., 2013).

The enzyme CD73 and the adenosine signaling pathway emerge as promising therapeutic targets in the prostate cancer scenario. Preclinical studies reveal that anti-CD73 monoclonal antibodies exhibit remarkable efficacy in inhibiting tumor growth and metastasis by suppressing cell adhesion. However, the ubiquitous expression of CD73 in healthy tissues raises concerns regarding the potential toxicity of these antibodies. Phased clinical trials (I, II, and III) explore combination therapies, including CD73 inhibitors, in various cancer types, with emphasis on prostate cancer (Gardani et al., 2024).

As a consequence of this process, ADO increases in the TME and exerts multiple immunosuppressive actions to reduce antitumor immunity due to its anti-inflammatory profile, suppressing cells such as phagocytes, dendritic cells, natural killer cells, T cells like Th17, B cells, and macrophages by binding to the A2A receptor on their surface, represented in Fig. 1.

However, this context is not always detrimental, as ADO can also promote the activation of some regulatory and suppressive immune cells, such as myeloid-derived suppressor cells and other regulatory T cells (Tregs), to reduce tumor activity (Allard et al., 2019).

Fig. 1 explains the role of the CD39 and CD73 enzymes in the

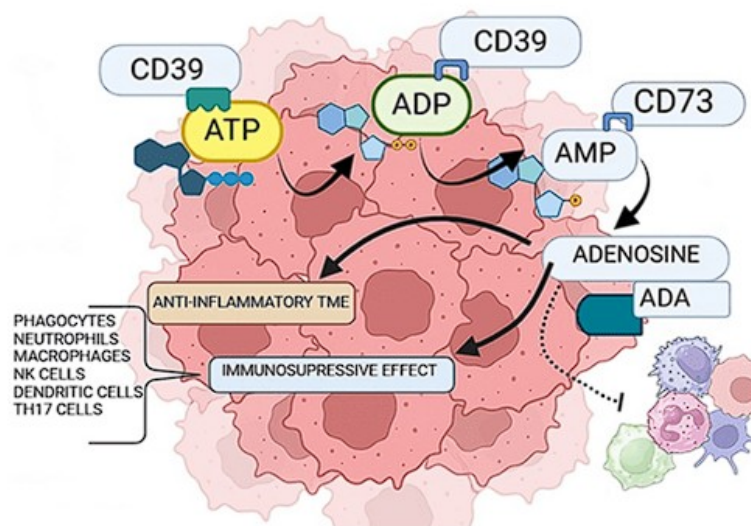


Fig. 1. Anti-inflammatory effects of adenosine.

conversion of extracellular nucleotides (ATP and ADP) into ADO, which has immunosuppressive effects. This process is particularly relevant in the context of inflammation and immune responses. Tumor cells are represented in red, and the immune cells are represented in the bottom right.

4. Modulation of reactive species in PCa

ROS, also known as oxidants, are commonly found as byproducts of normal aerobic cellular metabolism, typically formed through oxidative phosphorylation by the mitochondria, and are eliminated by various antioxidant mechanisms. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between these production and elimination processes (Jelic et al., 2021).

Among reactive oxygen and nitrogen species, there is a wide variety of forms found in different systems. Examples include superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH), nitric oxide (NO), peroxynitrite ($ONOO^-$), hypochlorous acid (HOCl), alkoxyl radical (RO), nitrogen dioxide (NO_2), alkyl peroxy radical (ROO), and several others (Khandrika et al., 2009; Gupta-Elera et al., 2012; Udensi et al., 2016).

In PCa, the most commonly found reactive species are O_2^- , H_2O_2 , as well as OH, NO, and $ONOO^-$. ROS interrelates with RNS; for example, NO, NO_2 , and $ONOO^-$ exert similar effects to ROS but, in excess, can lead to nitrosative stress (Khandrika et al., 2009).

The primary endogenous sources of reactive species are cellular mitochondria, microsomes, and peroxisomes. At the molecular level, ROS production occurs continuously in redox centers within enzymes or when ubiquinone (coenzyme Q10), also known as CoQ, the main electron transporter, accepts or donates electrons (Constanzo-Garvey et al., 2022; Jelic et al., 2021).

A reduction in this enzyme, transforming it into CoQH₂, accelerates ROS formation by the mitochondria. Bioenergetic conditions such as a high nicotinamide adenine dinucleotide (NAD/NADH) ratio and a high degree of protons generated through the inner mitochondrial membrane favor the appearance of ROS in the organism. This environment is essential for this phenomenon to occur (Jelic et al., 2021; Gupta-Elera et al., 2012).

Immune cells involved in inflammatory processes, such as granulocytes and macrophages, have mechanisms that depend on oxygen to form ROS through NADPH oxidase (NOX class) and myeloperoxidase (MPO). Other endogenous sources of ROS include enzymes such as lipoxygenase and cyclooxygenase, and the release of superoxide through these two enzymes becomes important in PCa due to the biosynthesis of prostaglandins, affecting the inflammatory profile (Udensi et al., 2016; Uemura et al., 2008).

The activation or inhibition of transcription factors, enzymes, and membrane channels, as well as the regulation of calcium-dependent signaling pathways and phosphorylation, are continuously occurring in healthy cells. In PCa, there is an innate oxidative stress due to the aggressive phenotype of the pathology. Increased ROS production leads to metabolic changes, activation of the androgen receptor, mitochondrial DNA mutations, unresolved inflammatory profile, and hypoxia (Sikka et al., 2003; Rebillard et al., 2013).

Reduced forms of oxygen, such as O_2^- and H_2O_2 , are produced during aerobic metabolism and can cause oxidative damage to nucleic acids, proteins, and lipids. Oxidative damage to nucleic acids like DNA is present in carcinogenesis and can lead to cross-linking between DNA and proteins or direct modification of purine and pyrimidine bases (Jelic et al., 2021; Khandrika et al., 2009; Chen et al., 2004).

Another G protein-coupled receptor (GPCR-Gα13) has been studied as a modulator of ROS. The receptor is overexpressed in advanced prostate cancers and plays an important role in cell migration and invasion. Activation of the Gα13 signaling pathway results in decreased O_2^- levels and promotes the activation of antioxidant genes, suggesting that Gα13 overexpression may help cancer cells survive under conditions of oxidative stress (WU and Casey, 2024).

4.1. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and metabolic shifts in prostate cancer progression

In addition to ROS playing this role in the initiation of PCa by targeting nuclear DNA or transcription factors, they can also affect mtDNA. The accumulation of these mutations with age leads to weaknesses in oxidative phosphorylation and the electron transport chain, which in turn increases ROS production and expansion to the cytoplasm of the cells (Pande et al., 2013; Paschos et al., 2013; Minelli et al., 2009).

Regarding mtDNA mutations, studies show that in normal prostate tissue, the higher concentration of zinc blocks the citric acid cycle (Krebs cycle) and accumulates citrate in the prostatic fluid. Thus, bioenergetics remain stable, causing low oxidation and generating fewer ROS. In malignancy, there is an early metabolic shift that decreases zinc present in tissues, likely due to decreased transport through zinc transporters (Zip1–3), and increases citrate oxidation, activating the m-aconitase pathway (Constanzo-Garvey et al., 2022; Khandrika et al., 2009).

This results in PCa having a higher energy turnover, with a higher rate of cellular respiration, and therefore generating more ROS. Various studies have demonstrated the role of mtDNA mutations in PCa, including conditions such as benign prostatic hyperplasia (BPH) or chronic prostatitis, showing that these changes, such as decreased extracellular-to-intracellular zinc transport, are found only in PCa (Pace et al., 2010; Khandrika et al., 2009).

Thus, if mtDNA mutations are indeed associated with high ROS production due to changes in oxidative phosphorylation, cells will also oxidize less pyruvate and NADH as part of the respiratory chain, resulting in an excess of lactate. This leads to anaerobic glycolysis, supporting the theory proposed by Warburg over 70 years ago that solid tumors have a higher rate of glycolysis (Gupta-Elera et al., 2012; Khandrika et al., 2009; Pande et al., 2013).

Molecular and biochemical aspects of aging, such as Harman's "free radical aging theory," suggest that the accumulation of biomolecular damage caused by reactive species plays an important role in senescence. Many researchers have supported the theory and added changes in mtDNA as a key factor in oxidative damage over time, promoting decreased cellular respiratory function and metabolic changes (Minelli et al., 2009; Constanzo-Garvey et al., 2022; Paschos et al., 2013; Pande et al., 2013; Pace et al., 2010).

Therefore, changes in mtDNA not only act as markers of aging but may also explain the increased incidence of PCa with advancing age. Most cells in PCa express the androgen receptor and respond to it at an early stage, facilitating their growth. These changes in androgen levels, among other growth factors such as insulin-like growth factor (IGF), epidermal growth factor (EGF), and nerve growth factor (NGF), among others, are also important for abnormal prostatic growth (Constanzo-Garvey et al., 2022; Jelic et al., 2021; Khandrika et al., 2009).

While testosterone is the primary hormone responsible for regulating prostate growth and function, the presence of estrogen receptors in this gland also plays a role in PCa development. Estradiol can be converted from testosterone in prostatic epithelial cells or absorbed from the general circulation. Elevated testosterone levels can be converted into estrogen through enzymes like aromatase, and the presence of estrogen, its receptors, and high testosterone concentrations may be related to oxidative damage and cell proliferation in the prostate (Balvan et al., 2015; Constanzo-Garvey et al., 2022; Khandrika et al., 2009).

The mechanisms of increased cell proliferation along with disorganized vascularization in PCa result in a hypoxic environment, leading to anaerobic glycolysis. Tumor cells can survive in this environment primarily through the activation and stabilization of HIF-1. Several studies suggest that this hypoxic scenario increases ROS production, which can lead to the activation of other factors such as VEGF (Gupta-Elera et al., 2012; Pande et al., 2013).

4.2. NADPH oxidases and nitric oxide synthases in prostate cancer: roles in oxidative stress and tumor progression

Regarding the NOX family, the NADPH oxidase-dependent reduction of molecular oxygen triggers the formation of superoxide and is subsequently dismutated to form H_2O_2 . The NOX family comprises 5 subtypes (1–5), and these play a variety of signaling events, including cell growth, survival, or apoptosis, depending on which subtype is active (Jelic et al., 2021; Khandrika et al., 2009; Chen et al., 2004).

PCa cells generate a high level of these enzymes, and studies suggest that NOX-1 triggers an angiogenic response and plays a role in the aggressive conversion of the tumor phenotype, while negative regulation of NOX-5 decreases cell growth and induces apoptosis. Other subtypes observed in PCa cell lines, such as NOX-4 and NOX-2, were not found in normal prostate cells (Constanzo-Garvey et al., 2022; Jelic et al., 2021).

The conventional surgical treatment of PCa results in an increase of three NADPH oxidase subtypes generating ROS (NOX-1, NOX-2, and NOX-4). Thus, the increased expression of these enzymes driven by ROS generation in PCa may lead to a more aggressive phenotype by modulating signaling cascades and could be a target for future therapeutic intervention (Constanzo-Garvey et al., 2022; Jelic et al., 2021; Khandrika et al., 2009).

Regarding RNS, it is known that when there is an increase in NO , NO_2^- , NO_3^- , and/or $ONOO^-$, the cell undergoes a process known as nitrosative stress. In PCa, studies have shown that plasma from individuals diagnosed with PCa contained higher levels of NO_2^- , NO_3^- , and NO byproducts than plasma from individuals with BPH. The family of enzymes responsible for NO biosynthesis is known as nitric oxide synthases (NOS) (Gupta-Elera et al., 2012; Khandrika et al., 2009; Pande et al., 2013).

These enzymes are also subdivided into classes: neuronal NOS (NOS1), calcium-independent NOS (NOS2 or iNOS), and calcium-dependent endothelial NOS (NOS3). Some studies indicate that NOS2

is upregulated in PCa cells. Additionally, it has been suggested that NOS3 protects PCa cells from apoptosis by reducing their sensitivity to tumor necrosis factor (Gupta-Eçera et al., 2012; Khandrika et al., 2009; Pande et al., 2013).

5. The role of P2 receptors in redox biology

P2 receptors have been widely described as modulators of reactive species. Among them, the most relevant in this context is P2X7. This receptor is closely related to the induction of H_2O_2 production through a mechanism dependent on intracellular Ca^{2+} release. Some researchers have confirmed the role of P2X7 using receptor antagonists and agonists, and the changes induced in reactive species production via activation of NADPH oxidase (Bulanova et al., 2005; Burnstock; Di Virgilio, 2013).

Activation of the NOX family through NADPH oxidase, as well as the generation of $ONOO^-$, are also crucial for the development and release of $IL-1\beta$, increasing the inflammatory context. Moreover, increased intracellular reactive species modulated by P2X7 result in subsequent activation of the NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome; however, some cell types are more susceptible than others to reactive species production induced by this receptor, expressed in Fig. 2 (Elsner et al., 2004; Di Virgilio, 2012).

P2X7 is not the only P2X receptor that modulates reactive species generation. In addition to P2X7, P2X4, and P2X2 receptors are also involved, demonstrating similar mechanisms of H_2O_2 production, which have a crucial impact on immune response and enzymatic activation in PCa (He et al., 2020; Qiao et al., 2022).

Regarding P2Y receptors, they also modulate the generation of reactive species. Some researchers have shown that P2Y1 protects cells such as astrocytes from H_2O_2 -induced apoptosis, increasing the reduction in the reaction. This effect was observed using a P2Y1 receptor agonist, and when an antagonist was used, the protective effect was abolished (Le et al., 2019; Deaglio; Robson, 2011).

This effect may be related to the cytokine $IL-6$ because treatment

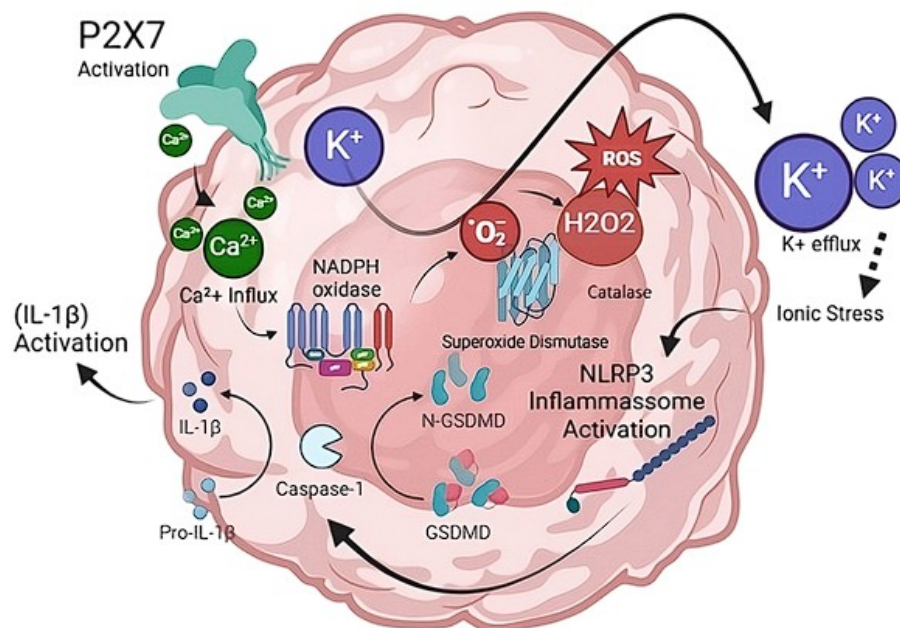


Fig. 2. Ionic change mechanism by P2X7.

with P2Y1 receptor agonists in cell cultures resulted in increased IL-6 levels, and when an anti-IL-6 antibody was used, the protective effects were reduced. In addition, antioxidant enzymes such as CAT and SOD, also seem to be related to the P2Y1 action (Burnstock, 2002; Camici et al., 2019).

P2Y2 receptor, in the presence of H_2O_2 and release of extracellular ATP modify Ca^{2+} metabolism. A contrary effect shown by the previous receptors is exemplified by P2Y11, where stimulation of this receptor appears to attenuate ROS production, and has been used as a therapeutic strategy involving purinergic signaling (Ventura; Thomopoulos, 2014; La Sala et al., 2003; Moriaki et al., 1999; Maynard and Sfanos, 2022).

Fig. 2 explains the mechanism of ionic change by P2X7, allowing the influx of Ca^{2+} , which leads to the activation of NADPH oxidase, increasing the concentration of ROS, especially superoxide and hydrogen peroxide. Another mechanism illustrated is the efflux of K^+ facilitated by changes in ion channels, activating the NLRP3 inflammasome, and through caspase-1, activating the active form of IL-1 β .

5.1. CD39 and CD73 in redox biology

It is well established that oxidative stress significantly reduces the activity of CD39 and CD73 enzymes, while antioxidant activity can reverse this alteration. Additionally, ecto-nucleotidases are enzymes involved in regulatory T cells (Tregs) by degrading ATP and generating ADO. Certain T cells, such as CD8 cells, increase ROS production, which primarily elevates CD39 expression, potentially increasing ADO generation and activation of other specific receptors with immunoregulatory effects (Wang et al., 2022; Allard et al., 2019).

In prostate TME, oxidative stress induced by ROS increases the expression of CD39, primarily in CD8 T cells, which are known to enhance ROS production. This increase in CD39 expression can potentially amplify ADO generation and facilitate a pro-tumor environment by reducing the effectiveness of the antitumor immune response (Wang et al., 2022).

Similarly, elevated CD73 expression, which converts AMP into ADO, has also been observed as a cellular protection mechanism against oxidative stress. Studies suggest that CD73 overexpression in vascular endothelial cells can protect these cells from damage induced by H_2O_2 , one of the main byproducts of oxidative stress. This defense mechanism is critical in PCa, as preserving endothelial integrity can support tumor vascularization and, consequently, promote tumor progression (Moesta, 2020; Di Virgilio, 2009).

Although the activity of these enzymes is affected by reactive species, increased expression of CD39 and CD73 protects vascular endothelial cells against oxidative stress and H_2O_2 -induced damage. Some defense mechanisms in response to pathogen presence involve increased expression of CD73 to reduce ROS generation. However, this increase in CD73 activity can also create an immunosuppressive environment by generating large amounts of ADO, inhibiting the effective immune response and promoting tumor survival (Moesta, 2020; Di Virgilio, 2009).

5.2. Therapeutic potential of purinergic signaling and oxidative stress modulation in prostate cancer

Prostate cancer (PCa), a predominant malignancy among men, presents a significant challenge due to its complex pathophysiology and resistance to conventional therapies in advanced stages. The interplay between purinergic signaling and oxidative stress within the tumor microenvironment (TME) has emerged as a promising avenue for therapeutic intervention. Understanding these molecular interactions can pave the way for novel strategies targeting both tumor progression and immune modulation.

5.3. Purinergic signaling in PCa: a double-edged sword

The purinergic system, encompassing signaling molecules such as ATP and adenosine (ADO), specific receptors (P1 and P2), and enzymatic modulators like CD39 and CD73, plays a pivotal role in PCa progression. Extracellular ATP, primarily released during cellular stress or damage, acts as a danger-associated molecular pattern (DAMP). It interacts with P2 receptors, such as P2X7 and P2X4, inducing inflammatory responses, modulating angiogenesis, and influencing immune evasion mechanisms within the TME (Burnstock and Di Virgilio, 2013).

5.3.1. TP and immune activation

Elevated ATP levels in the extracellular space activate P2X7 receptors, leading to calcium influx and subsequent reactive oxygen species (ROS) production. This cascade stimulates the inflammasome, resulting in IL-1 β secretion and a pro-inflammatory environment. However, chronic inflammation can favor tumor survival by fostering genomic instability and angiogenesis (Di Virgilio, 2012; Elssner et al., 2004).

5.3.2. Adenosine and immunosuppression

ADO, generated from ATP by CD39 and CD73, exerts anti-inflammatory effects by binding to P1 receptors, particularly A2A and A2B. This activity promotes immune tolerance and suppresses T cell-mediated anti-tumor responses, facilitating tumor progression (Deaglio & Robson, 2011).

5.3.3. CD39 and CD73 as therapeutic targets

Elevated expression of CD39 and CD73 in PCa has been correlated with poor prognosis. Therapeutic inhibition of these enzymes can reduce ADO levels, enhancing anti-tumor immunity. Additionally, targeting these enzymes may mitigate oxidative stress-related cellular damage (Burnstock & Di Virgilio, 2013).

5.4. Oxidative stress and prostate cancer

ROS, including superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), are byproducts of cellular metabolism. In PCa, dysregulated ROS production contributes to DNA damage, mitochondrial dysfunction, and activation of oncogenic pathways. Furthermore, ROS interacts with purinergic signaling molecules, amplifying the immunosuppressive TME (Jelic et al., 2021).

5.4.1. Mitochondrial dysfunction

Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) in PCa cells lead to inefficient oxidative phosphorylation, increasing ROS production. This creates a vicious cycle of oxidative damage and metabolic reprogramming, promoting tumor aggressiveness (Pande et al., 2013; Minelli et al., 2009).

5.4.2. Inflammation and angiogenesis

ROS activate hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), which upregulates vascular endothelial growth factor (VEGF). This promotes angiogenesis, enabling tumor survival in hypoxic conditions (Gupta-Elera et al., 2012).

5.4.3. Therapeutic modulation of ROS

Antioxidants targeting ROS production or enhancing cellular antioxidant defenses, such as superoxide dismutase (SOD) mimetics, show potential in reducing oxidative stress in PCa. Additionally, inhibitors of NADPH oxidase (NOX) enzymes can diminish ROS-mediated damage (Jelic et al., 2021; Khandrika et al., 2009).

5.5. Integrative approaches to target purinergic signaling and ROS

5.5.1. P2 receptor modulation

P2X7 Inhibition: Antagonists targeting P2X7 can reduce ROS generation and inflammasome activation, mitigating the pro-tumor inflammatory milieu (Di Virgilio and Adinolfi, 2017).

P2Y Receptor Regulation: While P2Y2 promotes tumor proliferation, P2Y1 exerts protective effects by reducing H2O2-induced apoptosis. Therapies modulating these receptors offer a tailored approach to PCa management (Le et al., 2019).

CD39/CD73 Blockade: Combining CD39/CD73 inhibitors with immune checkpoint inhibitors (e.g., anti-PD-1/PD-L1) has shown synergistic effects in enhancing anti-tumor immunity (Burnstock and Di Virgilio, 2013). Targeting these enzymes may also reduce ROS-induced oxidative damage, preserving normal cellular function (Martinelli et al., 2021).

Antioxidant Therapy: Molecules like N-acetylcysteine (NAC) and vitamins C and E can scavenge ROS, reducing oxidative stress. Combining antioxidants with purinergic signaling inhibitors may provide a dual benefit by targeting both oxidative damage and immunosuppression (Gupta-Elera et al., 2012).

5.6. Future directions

Exploring the interplay between purinergic signaling and oxidative stress opens avenues for precision oncology in PCa. Potential strategies include:

Biomarker Development: Identifying molecular signatures of purinergic signaling and oxidative stress in PCa for personalized therapy (Boerrigter et al., 2020).

Combination Therapies: Integrating purinergic inhibitors with existing therapies, such as androgen deprivation therapy (ADT) or radiotherapy, to enhance efficacy (Bekelman et al., 2018).

Nanomedicine: Utilizing nanoparticles for targeted delivery of ROS modulators or purinergic inhibitors to tumor sites (Hayano et al., 2016).

Genome Editing System: Identifying different genes related to the development of PCa and using systems such as CRISPR to modify it. (Charpentier and Doudna, 2025)

Molecular Agonists: Use of agonists of molecules directly involved in pyroptosis and inflammatory chemotaxis processes, such as DMB, which can generate new therapeutic combinations (Shentu et al., 2024).

6. Conclusion

In PCa, extracellular ATP activates P2 receptors, which connect to other signaling pathways such as MAPK and HIF-1. This modulates transcription factors like VEGF and creates an inflammatory environment by releasing pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , through the NLRP3 inflammasome. Additionally, there are changes in bioenergetics and mtDNA, with the activation of NADPH oxidase, which increases the production of ROS.

ADO has anti-inflammatory effects, impacting the anti-cancer response mainly through T cells. The outcome of this system can have both pro-tumor and anti-tumor effects, depending on specific factors in the TME and surrounding healthy cells. Furthermore, the presence of CD39 and CD73 enzymes in the purinergic signaling cascade also influences ROS production and the inflammatory profile. When there is greater ATP degradation, generating more ADO, the TME becomes immunosuppressive and anti-inflammatory. On the other hand, this effect can reduce oxidative damage caused by ROS, which is produced when more ATP is present. In PCa, mitochondrial energy depletion occurs, and when ATP is degraded, cellular apoptosis mechanisms are reduced due to the immunosuppressive environment.

There is a presence of a pro-inflammatory cellular TME, primarily due to the presence of ATP and ROS with the entire derived signaling cascade. However, this mechanism may lead to pro-tumor collateral

damage, such as uncontrolled cellular proliferation, and other conditions like angiogenesis, leading to tumor progression.

The impact of PCa in purinergic signaling and reactive species causes a series of changes in the bioenergetics of healthy cells, alters the immune responses in TME, and can induce the worst prognosis through invasion, metastasis, apoptosis, and also cell proliferation (Di Virgilio, 2012; Wang et al., 2022; Shentu et al., 2024). This, understanding of these mechanisms may lead us to better approaches in cancer therapies and the development of new therapeutic combinations, depending on the stage of PCa that could reveal the state of the immune response system.

Purinergic signaling and oxidative stress represent interconnected pathways influencing PCa progression and treatment resistance. Therapeutic interventions targeting these mechanisms hold promise for improving outcomes in PCa patients. Advancing our understanding of these pathways and their interplay within the TME will be crucial in developing innovative, effective therapies.

There are a few relevant perspectives from now, one of them is to relate the synergistic role with inflammation in a more detailed way, facing the inflammasome complexes as a crucial strategy from now, once they are capable of predicting when and where to act against the pro-tumoral effects lead by the disbalance between tissue repair and DAMP or immunosuppressive effects.

Funding sources

This work was supported by Santa Catarina State Research and Innovation Support Foundation, FAPESC [grant numbers: CAP2023091000008 and 2024TR002211] and Federal University of Fronteira Sul, UFFS [grant numbers: 275/GR/UFFS/2023, 154/GR/UFFS/2024 and 73/GR/UFFS/2023].

Declaration of Competing Interest

This is an academic work and there is no conflict of interest.

References

- Achard, V., et al., 2021. Localized and locally advanced prostate cancer: treatment options (Mar). *Oncology* 99 (7), 413–421 (Mar).
- Adinolfi, E., Capece, M., Amoroso, F., De marchi, E., Franceschini, A., 2015. Emerging roles of P2X receptors in cancer. *Curr. Med. Chem.* 22 (7), 878–890.
- Allard, D., Chrobak, P., Allard, B., Messaoudi, N., Stagg, J., 2019. Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. *Immunol. Lett.* 205, 31–39.
- Amoroso, F., et al., 2015. Emerging roles of P2X receptors in cancer. *Curr. Med. Chem.* 22 (7), 878–890.
- Balvan, Jan, et al., 2015. Oxidative stress resistance in metastatic prostate cancer: renewal by self-eating (Dec). *PLOS ONE* 10 (12), e0145016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145016>.
- Bekelman, J.E., et al., 2018. Clinically Localized Prostate Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of an American Urological Association/American Society for Radiation Oncology/Society of Urologic Oncology Guideline (Sept). *J. Clin. Oncol.: Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* (Sept).
- Boerrigter, E., et al., 2020. Clinical utility of emerging biomarkers in prostate cancer liquid biopsies (Feb). *Expert Rev. Mol. Diagn.* 20 (2), 219–230 (Feb).
- Burnstock, G., 2002. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 22, 364–373.
- Burnstock, G., Di Virgilio, F., 2013. Purinergic signaling and cancer. *Purinergic Signal.* 9 (4), 491–540.
- Camicci, M., et al., 2019. Purine-metabolising enzymes and apoptosis in cancer (Sep). *Cancers* 11 (9) (Sep).
- Chen, Q., et al., 2020. CD73 Acts as a Prognostic Biomarker and Promotes Progression and Immune Escape in Pancreatic Cancer. *J. Cell Mol Med* 24 (15), 8674–8686.
- Charpentier, E., Doudna, J.A., 2025. CRISPR-Cas9: uma ferramenta para a edição de genes. *Unidade Max Planck para a Ciência dos Patógenos. Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA, Berlim, Alemanha.*
- Constanzo-Garvey, A.M., Franz, D.N., Westphal, M.L., Feng, Y., 2022. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in prostate cancer. *Cell. Oncol.* v. 44 (n. 1), 1–12.
- Deaglio, Silvia, Robson, Simon C., 2011. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv. Pharmacol.* 61, 301–332.
- Di Virgilio, F., et al., 2016. P2 Receptors in cancer progression and metastatic spreading (Aug). *Curr. Opin. Pharmacol.* 29, 17–25 (Aug).

- Di Virgilio, F., Adinolfi, E., 2017. Extracellular purines, purinergic receptors, and tumor growth. *Oncogene* 36, 1–11.
- Di Virgilio, F., 2012. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res.* 72 (21), 5441–5447.
- Di Virgilio, F., Sarti, A., Coutinho-Silva, C., 2020. R. purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am. J. Physiol. -Cell Physiol.* 318 (5), C832–C835.
- Di Virgilio, F., Vuerich, M., 2015. Purinergic signaling in the immune system. *Auton. Neurosci.: Basic Clin.* 191, 117–123.
- Elsner, Andreas, et al., 2004. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 β processing and release. *J. Immunol.* 172 (8), 4987–4994.
- Gardani, C.F.F., et al., 2024. The potential role of purinergic signaling in cancer therapy: perspectives on anti-CD73 strategies for prostate cancer. *Front. Immunol.* v. 14 (S.I), 1–8.
- Gardani, C.F.F., et al., Mar. 2019. Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in the blood plasma of prostate cancer patients. *Purinergic Signal.* 15 (1), 95–105.
- Gupta-elera, G., Maher, J.R., Tan, M., Wang, S.M., 2012. The role of oxidative stress in prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138 (2), 351–359.
- Hayano, T., et al., 2016. Pseudogenes, misannotated genes, and the emergence of novel proteins in cancer: challenges and opportunities (Sept). *J. Clin. Investig.* 126 (9), 3332–3341 (Sept).
- He, J., et al., 2020. Inhibiting the P2X4 Receptor Suppresses ProstateCancer Growth In Vitro and In Vivo, Suggesting a Potential Clinical Target. *Cells* 9 (11), 2511.
- Jelic, M., Masic, T., Sekulic, M., Zlatkovic-Svetanovic, M., 2021. Oxidative stress and prostate cancer: mitochondrial involvement in tumorigenesis and therapy. *Front. Oncol.* v. 11 (n. 626), 234–246.
- Khandrika, L., Rieger-Christ, K., Andrichke, S., Singh, S., Lokeshwer, B., 2009. Reactive oxygen species in prostate cancer development and progression. *Prostate* 69 (4), 431–444.
- Kunzi, B.M., et al., 2011. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growthand metastasis of colorectal cancer. *Purinergic Signal.* 7 (2), 231–241.
- La sala, A., Ferrari, D., Di virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., Girolomoni, G., 2003. Alerting and tuning the immune response byextracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.* 73 (3), 339–343.
- Liu, M., et al., 2010. Evaluation of Adenosine Deaminase Activity and Its Isoenzymes in Pleural Effusions: Diagnostic and Clinical Implications. *J. Clin. Lab. Anal.* 24, 288–294.
- Maynard, J.P., Sfanos, K.S., 2022. P2 purinergic receptor dysregulation in urologic disease. *Purinergic Signal.* 18 (3), 267–287.
- Martinelli, S., et al., 2021. CD39 and CD73 ectonucleotidases in immunity, inflammation, and cancer: pathologic implications and therapeutic targets (Mar). *Front. Immunol.* 12 (Mar).
- Minelli, A., Benedetti, S., Calandrini, D., Amiri, S., 2009. The role of oxidative stress in prostate cancer. *Free Radic. Biol. Med.* v. 47 (n. 8), 797–806.
- Moesta, A.K., Li, X.Y., Smyth, M.J., 2020. Targeting CD39 in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 739–755.
- Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Higashino, K., 1999. Enzymes involved in purine metabolism-a review of histochemical localization and functional implications. *Histol. Histopathol.* 14 (4), 1321–1340.
- Pace, G., Girola, A., Saloni, A., Andretta, P., Calderone, A., 2010. Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Eur. Urol.* v. 58 (n. 4), 637–644.
- Pande, M., Abraham, R.N., Xiao, Y., Neuzil, J., 2013. Mitochondrial mutations in prostate cancer: a systematic review. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* v. 16 (n. 2), 141–148.
- Paschos, K.A., Sanders, M., Lindsay, P., Koutrouli, S., 2013. Nitrosative and oxidative stress in prostate cancer. *Prostate Cancer* v. 17 (n. 4), 195–208.
- Qiao, C., et al., 2022. ATP-gated P2X7 receptor as a potential target for prostate cancer. *Hum. Cell* 35 (5), 1346–1354.
- Rathbone, M.P., et al., 1992. Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 28 (7), 529–536.
- Rebillard, A., Ballaier, M., Venditti, P., Lapointe, M., 2013. Prostate cancer and oxidative stress: the role of mitochondrial function. *Mol. Cell. Endocrinol.* v. 376 (n. 1–2), 1–12.
- Shentu, J., Lou, H., Duan, S., 2024. DMB-induced GSDMD-mediated pyroptosis: a novel therapeutic strategy for enhancing anti-tumor immunity. *Cell Death Discov.* 10 (482).
- Sikka, S.C., Mehrle, A., Hussain, S., 2003. Role of oxidative stress in prostate cancer progression. *J. Androl.* v. 24 (n. 5), 679–686.
- Spychala, J., 2000. Tumor-promoting functions of adenosine. *Clin. Pharm. Therap.* 87 (2–3), 161–173.
- Tafani, M., et al., 2011. Hypoxia-increased RAGE and P2X7R expression regulates tumor cell invasion through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF- κ B. *Carcinog* 32 (8), 1167–1175.
- Udensi, U.K., Tunnell, T., Yeung, M.L., Hergenrother, P.J., 2016. Role of prostaglandin biosynthesis in inflammation and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* v. 4 (n. 1), 40–48.
- Uemura, H., Nakai, Y., Hoshi, N., Tsukamoto, T., 2008. Involvement of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* v. 11 (n. 4), 232–237.
- Wang, J., Du, L., Chen, X., 2022. Adenosine signaling: Optimal target for gastric cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 16 (13).
- WU, D.L., Casey, Patrick J., 2024. GPCR-Ga13 involvement in mitochondrial function, oxidative stress, and prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* v. 25 (n. 7162).
- Xia, Y., Zhao, D., Liu, T., Chen, Z., Liu, Y., Li, W., 2022. The role of oxidative stress in prostate cancer: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* v. 2022, 1–15.

Further reading

- Chen, W., et al., 2015. Elevated serum adenosine deaminase levels in secondaryhemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int. J. Lab. Hematol.* 37 (4), 540–550.
- Di Virgilio, F., et al., 1998. Purinergic P2X7 receptor: a pivotal role in inflammation and immunomodulation. *Drug Dev. Res.* 45, 207–213.

Rafael Zatti Rossetto, PT. Sp. Physiotherapist with experience in general molecular research.

Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel Dr. Maciel is an Assistant Professor (Class A) at the Federal University of Fronteira Sul (UFFS), Chapecó campus. She teaches Genetics, Molecular Biology, and Embryology in the Nursing and Medicine programs at UFFS. Additionally, she serves as the coordinator of the Master's Program in Biomedical Sciences at UFFS, focusing on research in Oxidative Stress, Inflammation, and the Purinergic System. Sarah holds a Ph.D. in Biological Sciences with a concentration in Genetics from the Federal University of Paraná (UFPR). She completed a research internship in molecular pharmacology at the 'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri' in Milan, Italy, funded by a CAPES PDPE scholarship. Her research contributions include numerous publications in international journals, particularly on the pathophysiology of cancer.

Andréia Machado Cardoso Dr. Cardoso is Professor of Biochemistry and Immunology of the Medicine Course at Federal University of Fronteira Sul (UFFS - Brazil) and Researcher of the Graduate Program in Biomedical Sciences (UFFS). For over 14 years, her research group has a long-standing interest in the mechanisms related to the involvement of purinergic signaling and oxidative injury in response to cancer and others non communicable diseases. The focus of her research has been the physiopathology mechanisms of purinergic signaling (specially ectonucleotidases and purinergic receptors) and oxidative injury on disease development and possible therapeutic avenues. Dr. Cardoso has authored more than 60 pubmed-indexed papers.