

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
CURSO DE MEDICINA**

LUCAS NERI BRAZ

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA
PURINÉRGICO EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER COLORRETAL**

**CHAPECÓ
2024**

LUCAS NERI BRAZ

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA
PURINÉRGICO EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER COLORRETAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de bacharel em Medicina.

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

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daniela Zanini

CHAPECÓ

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Braz', Lucas Neri

Avaliação da expressão gênica de componentes do sistema purinérgico em indivíduos com câncer colorretal / Lucas Neri Braz'. -- 2024.

41 f.

Orientadora: Doutora Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Co-orientadora: Doutora Daniela Zanini

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2024.

1. Câncer Colorretal. 2. Linfócitos. 3. Sistema purinérgico. I. Maciel, Sarah Franco Vieira de Oliveira, orient. II. Zanini, Daniela, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

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

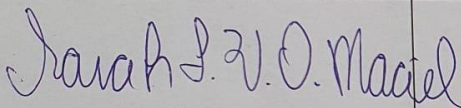
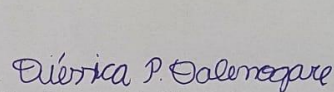
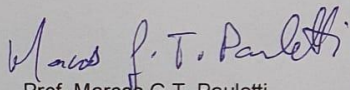
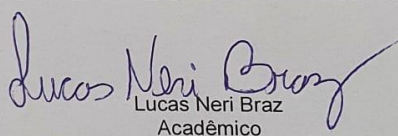
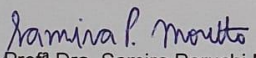
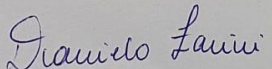
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO DE MEDICINA

No dia vinte e oito de junho do ano de dois mil e vinte e quatro, em sessão realizada presencialmente, deu-se a defesa do Trabalho de Curso (TC) intitulado "ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA PURINÉRGICO EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER COLORRETAL", elaborado pelo acadêmico Lucas Neri Braz e orientado pela Profa Dra Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel. A Banca Avaliadora constituída pela Dra Diessica Padilha Dalenogare e Prof. Marcos G. T. Pauletti, *aprovaram* o referido trabalho, com nota *9,0*. A Professora de TC do Curso de Medicina registra, publica, assina e dá fé à presente ata.

Chapecó, 28 de Junho de 2024.

 Profa Dra Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel Orientadora	 Dra. Diessica Padilha Dalenogare Banca Avaliadora
 Prof. Marcos G.T. Pauletti Banca Avaliadora	 Lucas Neri Braz Acadêmico
 Profª Dra. Samira Peruchi Moretto Professora de TCC do Curso de Medicina	 Profa Dra Daniela Zanini Coorientadora

Dedico este trabalho à minha mãe, Inês de Oliveira Neri, por todo o apoio e dedicação ao longo de toda a minha vida. Seu exemplo de força e perseverança foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal (CCR) é o segundo câncer de maior incidência em mulheres e o terceiro em homens, sendo responsável por cerca de 10% do total de mortes relacionadas a câncer no mundo. Apesar de na maioria das vezes os pacientes com CCR em estágios iniciais serem assintomáticos, o diagnóstico precoce é fundamental para evitar piora clínica e prognóstica. Os exames de rastreio exercem função primordial, associados à avaliação clínica, na conclusão diagnóstica. Como padrão ouro, a colonoscopia possibilita a biópsia de lesões pré-malignas e permite a ressecção cirúrgica de adenocarcinomas em estágios iniciais. Em casos de doença avançada, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia são consideradas. Pesquisas envolvendo as relações entre o sistema purinérgico e a patogênese do CCR vêm despontando. O sistema purinérgico tem como elementos nucleotídeos e nucleosídeo extracelulares, receptores e enzimas que degradam esses nucleotídeos. Dentre as enzimas, podemos citar a NTPDase (sendo CD39 a mais relevante), que hidrolisa ATP a ADP e ADP a AMP; a ecto-5'-nucleotidase (CD73), que hidrolisa AMP a adenosina; e a adenosina desaminase, que hidrolisa adenosina em inosina. O receptor P2X7 é o mais estudado da família P2, tem como agonista o ATP e é reconhecido por exercer um papel central em processos inflamatórios. **Objetivo:** O estudo visa analisar a expressão gênica das ectonucleotidases CD39 e CD73, e do receptor P2X7 nos linfócitos de pacientes com CCR e de indivíduos controle. **Metodologia:** Trata-se de estudo transversal, em que os pacientes foram selecionados a partir de contato prévio dos pesquisadores com o Hospital Regional do Oeste (Chapecó, SC). O estudo contou com 13 pacientes com CCR e 11 indivíduos controle. Antes do dia do procedimento cirúrgico para remoção do tumor, foi feito contato pessoalmente com os pacientes para explicar a pesquisa, assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e coleta de 10 ml de sangue de cada participante. Também foram coletadas informações clinicopatológicas dos prontuários médicos dos pacientes, utilizadas para complementar as análises biológicas. Os indivíduos controles foram selecionados com base no pareamento por idade e gênero em relação aos pacientes. O método de obtenção dos dados de expressão gênica foi por RT-qPCR. **Resultados:** A expressão relativa do gene P2X7 foi 1.7 vezes maior entre os indivíduos com CCR em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não houve diferença na expressão relativa dos genes CD39 e CD73 entre os grupos. Houve correlação positiva entre as expressões relativas dos genes CD39 e CD73 tanto

no grupo controle ($p < 0,001$; $r = 0,9584$) quanto no grupo dos indivíduos com CCR ($p = 0,0027$; $r = 0,7577$). **Conclusão:** Os resultados mostram que o CCR aumenta a expressão do receptor P2X7 em linfócitos. Espera-se que esse trabalho possa contribuir para o melhor entendimento do papel do sistema purinérgico na fisiopatologia do CCR e motive mais estudos relacionados à carcinogênese colorretal e a sinalização purinérgica.

Palavras-chave: Câncer colorretal; CD39; CD73; P2X7; Linfócitos.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the second most common cancer in women and the third in men, accounting for about 10% of total cancer-related deaths worldwide. Although early-stage CRC patients are often asymptomatic, early diagnosis is crucial to prevent clinical and prognostic deterioration. Screening tests play a fundamental role, along with clinical evaluation, in diagnostic conclusion. As the gold standard, colonoscopy allows for biopsy of premalignant lesions and surgical resection of early-stage adenocarcinomas. In cases of advanced disease, radiotherapy, chemotherapy, and immunotherapy are considered. Research on the relationships between the purinergic system and CRC pathogenesis is emerging. The purinergic system includes extracellular nucleotides and nucleosides, receptors, and enzymes that degrade these nucleotides. Key enzymes include NTPDase (with CD39 being the most relevant), which hydrolyzes ATP to ADP and ADP to AMP; ecto-5'-nucleotidase (CD73), which hydrolyzes AMP to adenosine; and adenosine deaminase, which hydrolyzes adenosine to inosine. The P2X7 receptor, the most studied of the P2 family, has ATP as an agonist and is recognized for its central role in inflammatory processes.

Objective: This study aims to analyze the gene expression of ectonucleotidases CD39 and CD73, and the P2X7 receptor in lymphocytes from CRC patients and control individuals.

Methodology: This is a cross-sectional study, where patients were selected based on previous contact between the researchers and the Regional Hospital of the West (Chapecó, SC). The study included 13 CRC patients and 11 control individuals. Before the surgical procedure for tumor removal, patients were personally contacted to explain the research, obtain informed consent, and collect 10 ml of blood from each participant. Clinicopathological information from the patients' medical records was also collected to complement the biological analyses. Control individuals were selected based on age and gender matching with the patients. Gene expression data were obtained by RT-qPCR.

Results: The relative expression of the P2X7 gene was 1.7 times higher among individuals with CRC compared to the control group ($p < 0.05$). There was no difference in the relative expression of CD39 and CD73 genes between the groups. A positive correlation was found between the relative expressions of CD39 and CD73 genes in both the control group ($p < 0.001$; $r = 0.9584$) and the CRC group ($p = 0.0027$; $r = 0.7577$).

Conclusion: The results show that CRC increases the expression of the P2X7 receptor in lymphocytes. It is hoped that this work will contribute to a better understanding of the role of the purinergic system in CRC pathophysiology and encourage more studies related to colorectal carcinogenesis and purinergic signaling.

Keywords: Colorectal cancer; CD39; CD73; P2X7; Lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Quantificação da expressão gênica do receptor P2X7 em linfócitos de pacientes com CCR (n = 11) e de indivíduos controle (n = 10).....	26
Figura 2 – Quantificação da expressão gênica dos genes CD39 e CD73 em linfócitos de pacientes com CCR e de indivíduos controle (n = 12 e n = 11 para pacientes e controle, respectivamente, em relação ao gene CD39; e n = 12 e n = 8 para pacientes e controles, respectivamente, em relação ao gene CD73).....	27
Figura 3 – Análise da correlação entre a expressão do gene CD39 e CD73 em controles e em pacientes	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Padronização da reação de RT-qPCR.....	22
Quadro 2 – Sequência dos iniciadores forward e reverse para os genes alvos e de referência. 22	
Quadro 3 – Características dos pacientes.	24
Quadro 4 – Características dos controles.	24
Quadro 5 – Estadiamento tumoral dos pacientes conforme grupo TNM.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
Ado	Adenosina
AMP	Adenosina Monofosfato
APC	Gene Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Adenosina Trifosfato
CCR	Câncer Colorretal
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	DNA Complementar
CID	Classificação Internacional de Doenças
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DAMP	Padrão Molecular Associado ao Dano
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
ENTPD1	Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase 1
F	Forward (Iniciador Forward)
HRO	Hospital Regional do Oeste
IFN- γ	Interferon Gama
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
MA	Massachusetts (estado nos EUA)
NK	Natural Killer
PB	Pares de Bases
R	Reverse (Iniciador Reverse)
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante Beta
Th-1	Linfócitos T Helper 1
TME	Microambiente Tumoral
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
Tregs	Células T Reguladoras

UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
USA	Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
±	Desvio Padrão
ng	Nanograma
p	Valor de p (probabilidade estatística)
pb	Pares de Bases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CÂNCER COLORRETAL	16
2.2	MICROAMBIENTE TUMORAL E RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO CÂNCER	17
2.3	SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER COLORRETAL.....	18
3	METODOLOGIA	20
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	20
3.2	SELEÇÃO DE PARTICIPANTES	20
3.3	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	21
3.3.1	Coleta e processamento das amostras biológicas	21
3.3.2	Análise da expressão gênica por RT-qPCR	21
3.3.3	Análise dos prontuários médicos	22
3.3.4	Análises estatísticas	23
4	RESULTADOS.....	24
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	APÊNDICE A – TCLE.....	37

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais comuns ao redor do mundo, sendo uma das principais causas de mortalidade por câncer (GLOBOCAN, 2024). Embora uma fração desses casos seja de origem hereditária, a maioria dos CCRs se desenvolve de forma esporádica, frequentemente associada a fatores relacionados ao estilo de vida e a exposições ambientais prolongadas (DEKKER, 2019). A progressão do CCR envolve mecanismos sofisticados de evasão imunológica, em que células tumorais conseguem escapar da destruição pelo sistema imunológico (TANG et al., 2020).

A resposta imunológica contra tumores é modulada por diversos fatores presentes no microambiente tumoral, incluindo a presença de nucleotídeos extracelulares, como a adenosina trifosfato (ATP) e seus correspondentes hidrolisados. Estes nucleotídeos atuam através do sistema purinérgico, que inclui receptores e enzimas, desempenhando papéis cruciais na regulação da resposta imune (BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014). Entre os receptores purinérgicos, o P2X7 é notável por sua capacidade de mediar a liberação de citocinas pró-inflamatórias e induzir a morte celular em resposta à ativação pelo ATP. A expressão aumentada de P2X7 em linfócitos tem sido associada a uma resposta imunológica mais eficiente contra células cancerígenas (JACOB et al., 2013).

Além do papel pró inflamatório do receptor P2X7, as ectonucleotidases CD39 e CD73 também desempenham papel crucial na determinação do padrão inflamatório pelo qual o microambiente tumoral (TME) será caracterizado. A atividade aumentada da via enzimática de degradação do ATP em adenosina (Ado), diretamente modulado pelo comportamento das ectonucleotidases CD39 e CD73, favorece a configuração de um meio antitumoral e pró carcinogênico (ANTONIOLI et al., 2020).

Nesse sentido, considerando o impacto na saúde pública associado à alta incidência e mortalidade do CCR e a influência da via de sinalização purinérgica na modulação da resposta imunológica do hospedeiro contra o tumor, justifica-se buscar maior compreensão a respeito do perfil de expressão gênica do receptor P2X7 e das ectonucleotidases CD39 e CD73 em pacientes com CCR atendidos no Hospital Regional do Oeste (HRO) no município de Chapecó (SC).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo revisa a literatura sobre o CCR, abordando desde a patogênese até as opções de rastreamento e tratamento. Adentraremos no estudo do microambiente tumoral e da resposta imunológica ao câncer, ampliando a compreensão sobre como o entorno celular e molecular afeta a progressão da doença e as intervenções terapêuticas. A análise se concentrará na composição e funcionalidade do microambiente tumoral, enfatizando como as interações entre células tumorais, células imunológicas e outros componentes influenciam a agressividade do tumor e a eficácia da resposta imune. Discutiremos, ainda, como essas dinâmicas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais inovadoras e eficazes.

2.1 CÂNCER COLORRETAL

O CCR é uma neoplasia maligna que surge devido a alterações genéticas e epigenéticas no epitélio do cólon ou reto. Ele figura entre as neoplasias mais incidentes ao redor do mundo, ocupando o terceiro lugar em incidência e o segundo em mortalidade, com cerca de 10% do total de óbitos relacionados ao câncer, estando atrás apenas do câncer de pulmão nessa categoria (DEKKER, 2019; WOLF, 2018).

O cenário brasileiro se apresenta alinhado com a tendência de incidência e mortalidade global, sendo o segundo câncer mais incidente em homens, com 30.164 casos diagnosticados no ano de 2022; e o terceiro em mulheres, com 29.954 casos, excluindo os tumores de pele do tipo não-melanoma. Em relação à mortalidade, o CCR foi responsável por 22.189 óbitos no mesmo ano (BRAY, 2024).

Nesse contexto, o conhecimento dos fatores de risco, manifestações clínicas, processos fisiopatológicos, indicações de rastreio, critérios de estadiamento e opções de tratamento se tornam fundamentais para a otimização da abordagem desse problema de saúde pública.

Dentre os fatores de risco modificáveis associados ao desenvolvimento de CCR, evidenciam-se obesidade, sedentarismo, alcoolismo, dieta rica em carne vermelha e pobre em frutas e vegetais. Entre os fatores não modificáveis, figuram história familiar positiva, síndromes hereditárias associadas ao CCR, diabetes tipo 2 e doença inflamatória intestinal (DEKKER, 2019; CA: A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS, 2018).

A progressão do CCR consiste em ausência de sintomatologia nos estágios iniciais, com o aumento da incidência de manifestações à medida que a doença avança, como mudança no

trânsito intestinal, sangue nas fezes, diarreia, constipação, dor abdominal e perda ponderal (DUAN et al., 2022).

A indicação da American Cancer Society para o rastreamento do CCR é que, indivíduos de risco moderado iniciem aos 45 anos e, após 75 anos de idade, não realizam exames de rastreio sem manifestações clínicas sugestivas de malignidade (CA: A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS, 2018).

O CCR se apresenta na forma familiar, hereditária e esporádica. Esta última, foco deste estudo, constitui cerca de 70% dos casos e ocorre em indivíduos que não apresentam histórico familiar da doença ou alterações genéticas hereditárias associadas (KANTH, 2017).

A patogênese do CCR é multifatorial e tem três principais sequências fisiopatológicas. A via mais frequente, em cerca de 70 a 90% dos casos, é a sequência clássica adenoma - adenocarcinoma, também referida como via da instabilidade cromossômica. Nesta, ocorre o acúmulo de múltiplos eventos genéticos e epigenéticos em que lesões adenomatosas pré-cancerígenas progridem para carcinomas invasivos ao longo do tempo, se não detectadas e tratadas precocemente (DEKKER, 2019; LI et al., 2021).

Inúmeras vias de sinalização e transdução do sinal estão associadas a essa sequência, porém, mutações em alguns genes específicos, como Polipose Adenomatosa Coli (APC), oncogene viral do sarcoma de Rato de Kirsten (KRAS) e Proteína Tumoral P53 (TP53), influenciam de maneira mais significativa e elucidada na perturbação das vias celulares essenciais para o controle do ciclo celular e reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) (WAN et al., 2020; COLUSSI et al., 2013). A sequência fisiopatológica da neoplasia serrilhada e a da via de instabilidade de microssatélites correspondem ao remanescente dos casos (DEKKER, 2019; KIM & KIM, 2018).

2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL E RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO CÂNCER

Um fator importante para sustentar a instalação e proliferação da neoplasia consiste na regulação dos processos que ocorrem no microambiente tumoral (TME), como modulação do sistema imunológico, angiogênese, liberação de proteases que permitem a invasão tecidual e de fatores de crescimento tumoral. Esse ambiente é composto por uma complexa rede de componentes celulares e não celulares que interagem entre si e modulam a resposta imunológica do hospedeiro contra o tumor e os mecanismos de evasão da neoplasia, bem como sua proliferação para outros órgãos. Dentre esses constituintes constam: células tumorais,

imunológicas, vasos sanguíneos e linfáticos, fatores de crescimento, interleucinas, nucleotídeos, nucleosídeos, fibroblastos associados ao câncer, demais células do estroma e matriz extracelular. (LI et al., 2021; ZAFARI et al., 2022; HINSHAW & SJEVDE, 2019; WERB & LU, 2015; ANDERSON & SIMON, 2020).

A modulação do sistema imunológico a nível do TME é relevante e vem ganhando protagonismo como possível preditor prognóstico (GOODEN et al., 2011). A predominância de interleucinas pró inflamatórias em relação a anti-inflamatórias nesse ambiente, bem como a proporção entre linfócitos TCD8⁺ em relação a linfócitos T reguladores (Tregs), de maneira geral, caracterizam a eficácia do sistema imunológico em lidar com a neoplasia (JANG, 2013; (ALSALMAN et al., 2022).

O padrão de resposta provocado pelos linfócitos T helper 1 (Th-1) é pró inflamatória, caracterizado principalmente pela liberação de interleucina 2 (IL-2) e Interferon gamma (IFN- γ). Essas interleucinas são responsáveis por atuar por mecanismos diretos e indiretos no combate às células tumorais. As células Tregs, por outro lado, estão associadas a liberação de interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β), os quais estão, por sua vez, relacionados à supressão da resposta imunológica e progressão tumoral (ANDERSON & SIMON, 2020; TANG et al., 2020).

2.3 SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER COLORRETAL

Geoffrey Burnstock, na década de 1970, propôs a hipótese da molécula de adenosina trifosfato (ATP) como uma mensageira extracelular com receptores específicos, desafiando a visão convencional de que o ATP era apenas uma fonte de energia intracelular. Burnstock e seus colegas observaram que o ATP também atuava como um neurotransmissor, desempenhando um papel crucial na comunicação entre as células. Esta constatação revolucionária abriu novos horizontes para um complexo sistema de sinalização celular mediada por nucleotídeos e nucleosídeos (BURNSTOCK, 2014).

O avanço das pesquisas visando o entendimento do que, hoje, conhecemos como o sistema purinérgico permitiu o conhecimento dos atores envolvidos nessa complexa via de sinalização, que envolve nucleotídeos e nucleosídeos, enzimas e receptores. Essencialmente, a sequência de degradação do ATP a ADP, e do ADP a AMP é realizada pela enzima ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase 1 (ENTPD1), também conhecida como CD39. Já a ecto-5'-nucleotidase (CD73) degrada AMP a adenosina. Essa sequência de degradação

enzimática perpetrada pelas ectonucleotidases é fundamental para a modulação das concentrações de ATP e adenosina no ambiente extracelular e, consequentemente, a ativação de seus respectivos receptores (DI VIRGILIO & ADINOLFI, 2017; DI VIRGILIO, 2012).

Os receptores P1 são especificamente sensíveis à adenosina e cada um de seus subtipos está envolvido na modulação de processos celulares distintos. O receptor A2A, quando ativado pela molécula de adenosina, sinaliza um padrão de resposta anti-inflamatória. Já os receptores P2, ionotrópicos, têm alta afinidade pelo ATP e, especificamente quando o receptor P2X7 é ativado, deflagra resposta pró inflamatória (JACOB et al., 2013). Essa inter-relação de eventos envolvendo os elementos do sistema purinérgico é crucial para a modulação das concentrações de ATP e adenosina no TME (BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014).

O aumento dos níveis de ATP no meio extracelular ocorre por mais de uma via relacionada à neoplasia colorretal. O dano tecidual que o processo de invasão tumoral provoca acarreta a liberação de ATP como um padrão molecular associado ao dano (DAMP). A comparação do câncer a uma ferida que não cicatriza é apropriada para o entendimento da liberação de DAMPS e o estado inflamatório crônico associado ao avanço do câncer. Isto é, ao passo que é intuitivo associar a inflamação aguda a um preditor positivo de vantagem da resposta do hospedeiro ao tumor, a resistência da doença à resposta imunológica configura um quadro inflamatório arrastado, crônico, associado à exaustão de células imunológicas, propiciando um cenário favorável para a proliferação do CCR (HERNANDEZ, HUEBENER & SCHWABE, 2016; VULTAGGIO-POMA, SARTI & DI VIRGILIO, 2020).

Além do aumento do ATP extracelular mediado pela lesão tecidual, alterações no metabolismo mitocondrial também constituem uma via de elevação do nucleotídeo no TME. Uma vez que os mecanismos responsáveis pelo aumento do ATP extracelular estão aumentados, a determinação da concentração extracelular disponível para a ligação aos receptores P2X7 será, dentre outros fatores, principalmente determinada pelo grau de expressão e funcionalidade do eixo enzimático CD39 - CD73, que pode direcionar o substrato de ATP para a via de formação de Ado (CEKIC; LINDEN, 2016; ANTONIOLI et al., 2019; DEAGLIO et al., 2007; D'ANTONGIOVANNI et al., 2020).

Portanto, a relação entre o sistema purinérgico e o CCR está intimamente relacionada a fatores relacionados ao TME e à modulação da resposta imunológica.

3 METODOLOGIA

O presente capítulo apresenta a metodologia utilizada neste estudo, detalhando os procedimentos adotados para a caracterização do estudo, seleção de participantes, protocolos experimentais, análise de expressão gênica e análise estatística. O objetivo é proporcionar uma compreensão clara e precisa das etapas metodológicas seguidas, garantindo a replicabilidade e a validade dos resultados obtidos. O estudo foi conduzido com rigor científico e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS).

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo quantitativo observacional transversal, no qual foi avaliada a expressão gênica do receptor P2X7, e das ectonucleotidases CD39 e CD73 do sistema purinérgico, em linfócitos de pacientes com CCR e em indivíduos controle. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, sob o número de parecer 2.673.418.

3.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES

As análises foram realizadas a partir de amostras de sangue periférico de 13 pacientes diagnosticados com CCR, previamente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico, e 11 indivíduos controle sem diagnóstico de câncer. Os pacientes foram selecionados a partir de contato prévio dos pesquisadores com o serviço de Quimioterapia da Associação Hospitalar Lenoir Vargas Ferreira - Hospital Regional do Oeste (HRO), no município de Chapecó (SC), Brasil. Antes do início do tratamento, os pacientes realizaram consulta com o cirurgião oncológico responsável pelo serviço; nesse momento, foram convidados pelos pesquisadores a participar da pesquisa, sendo informados acerca dos objetivos do estudo e das intervenções que seriam realizadas. Os voluntários foram, então, convidados a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A seleção da amostra foi realizada respeitando os critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão consistiram em pacientes voluntários com idade igual ou superior a dezoito anos (18), diagnosticados com CCR, conforme CID 11, por médico oncologista ou proctologista, que não tivessem realizado a remoção cirúrgica do tumor ou iniciado o tratamento farmacológico antineoplásico. Os indivíduos do grupo controle selecionados foram voluntários

com idade igual ou superior a dezoito (18) anos e sem diagnóstico de CCR. Foram excluídos pacientes que apresentavam qualquer outro diagnóstico de câncer e/ou que já tivessem realizado a remoção cirúrgica do tumor ou iniciado o tratamento farmacológico.

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Coleta e processamento das amostras biológicas

Foi realizada a punção venosa para a realização de uma única coleta de sangue periférico, no volume de 10 mL, em tubos vacutainer contendo EDTA como anticoagulante, para o isolamento de linfócitos. Os indivíduos do grupo de controle foram selecionados em outros ambientes no Município (Centros de Saúde da Família, Cidade do Idoso, Central de Referência em Saúde Municipal), com base no pareamento por idade ($\pm$ 5 anos) e gênero em relação aos pacientes. O procedimento para a coleta de sangue foi o mesmo executado nos pacientes e só aconteceu após assinatura do TCLE. As análises moleculares foram realizadas nos laboratórios de pesquisa biológica da UFFS - Campus Chapecó (SC), onde também foram armazenadas as amostras já processadas em freezer a -80°C .

3.3.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

O RNA isolado das amostras foi tratado com a enzima DNase (a fim de evitar a contaminação com DNA), e posteriormente estocado em freezer a -80°C . As concentrações e pureza dos RNAs foram determinadas utilizando o espectrofotômetro "Nanodrop®" (Thermo Scientific). A retrotranscrição de até 2 μg de RNA para síntese de cDNA foi realizada com o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems), conforme especificações do fabricante. Após, foram preparadas soluções de uso do cDNA a 20 ng/ μL . As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento QIAquant 96 5 plex (Qiagen), com o protocolo "Sybr Green" (Applied Biosystems). A análise da expressão gênica por Quantificação Relativa foi realizada pelo método do DD_{Ct}. Em 10 μL de volume de reação, foram adicionados 2 μL de cDNA molde (40 ng), 20 μM dos primers forward e reverse e 5 μL de "Sybr Green" (Applied Biosystems).

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

$$DD_{Ct} = D_{Ct} - D_{Ct \text{ amostra calibradora}}$$

Os programas de PCR ocorreram conforme abaixo:

Quadro 1 – Padronização da reação de RT-qPCR

Reagentes	Volume na reação (uL)	Concentração total na reação
Água ultra-pura	2,75	
Iniciador forward e reverse	0,25	20 uM
SYBR green PCR Master mix	5,0	
cDNA (20 ng/uL)	2,0	40 ng
	V = 10,0	
Programa de PCR	2 min. a 50 °C 2 min. a 95 °C 45X: 15seg a 95 °C 1 min a 60 °C Curva de dissociação (pré-programada)	

Legenda: uM, micro molar; µl, microlitro; ng, nanogramas, T, volume total; °C, graus Célcius

As sequências dos iniciadores para os genes alvos foram obtidas conforme as especificações necessárias para análises de RT-qPCR e contemplando as regiões de junções de éxons (**Quadro 2**):

Quadro 2 – Sequência dos iniciadores forward e reverse para os genes alvos e de referência.

Gene	Forward	Reverse
<i>ACTB</i>	5'- GATGCAGAAGGAGATCACTGC	5'- AGTACTTGCGCTCAGGAGGA
<i>CD39</i>	5'- TGCCCCCTTATGGAAGATATAAAGGA	5'- TAACTGCTGCACCACTCCTG
<i>P2X7</i>	5'- GATCATCACTGGGCAGGAGGAAGG	5'- AAGACACCGTTGAAGGCACACTGG
<i>CD73</i>	5'- GACATGACTCTGGTGACCA	5'- GACCTTCAACTGCTGGAT

3.3.3 Análise dos prontuários médicos

As informações obtidas a partir dos prontuários médicos foram aquelas em relação à idade, sexo, estadiamento (TNM), história familiar de câncer e comorbidades (hipertensão, síndrome metabólica, diabetes, entre outras).

3.3.4 Análises estatísticas

Na análise estatística, a normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, as amostras que apresentaram distribuição gaussiana passaram pelo Teste t de Student. Já as análises não paramétricas foram realizadas pelo Teste de Mann-Whitney. Para as análises de correlação foi realizado o Teste de Pearson. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão, para variáveis paramétricas, e sob a forma de mediana e faixa de variação para variáveis não paramétricas. O software utilizado para as análises estatísticas foi o GraphPad Prism 8.

4 RESULTADOS

Neste estudo, dos 13 pacientes com CCR que foram avaliados, 69,2% (n = 9) eram homens e 30,7% (n = 4) mulheres. A idade média dos pacientes foi de $61,31 \pm 10,04$ anos (**Quadro 3**). No grupo controle, dos 11 indivíduos participantes, 36,3% (n = 4) eram homens e 63,7% (n = 7) mulheres, com idade média de $52,36 \pm 11,09$ anos, conforme é apresentado no **Quadro 4**. A diferença de idade entre os grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0501$). A caracterização do estadiamento (TNM) do CCR nos pacientes é apresentada no **Quadro 3**. Esclarece-se não ter sido possível acessar o estadiamento de 3 pacientes, pois a informação não constava em seus prontuários.

Quadro 3 – Características dos pacientes.

Pacientes	Sexo	Idade	TNM
1	F	41	T3N1M0
2	F	74	T3N1MX
3	M	59	T3N0M0
4	F	52	T3N1M0
5	M	53	T3N1M1
6	M	63	T4N1M1
7	M	63	T1N1M0
8	M	75	T1N0M0
9	M	70	-
10	M	55	-
11	M	56	-
12	F	73	T2N0MX
13	M	63	T3N1M1

Fonte: O autor (2024).

Quadro 4 – Características dos controles.

Controles	Sexo	Idade
1	M	58
2	M	77
3	F	42
4	M	53
5	F	53
6	F	50
7	F	58
8	M	38
9	F	47
10	F	60
11	F	40

Fonte: O autor.

O estadiamento do CCR de T1 a T4 descreve a extensão local do tumor primário, conforme definido pelo sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástase) (VOGEL et al., 2022). Analisando o estadiamento TNM dos pacientes conforme a Tabela 1, observa-se que 20% dos casos estavam no estágio T1, onde o tumor primário invade a submucosa; 10% no estágio T2, com invasão até a muscular própria; 60% no estágio T3, caracterizado pela invasão através da muscular própria o tecido pericólico; e 10% no estágio T4, onde o tumor invade diretamente o peritônio visceral ou atinge outras estruturas. Em relação ao acometimento linfonodal, o sistema TNM estratifica em N0 (ausência de metástase linfonodal), N1(até 3 linfonodos acometidos ou deposição tumoral na subserosa, mesentério ou tecidos pericolônicos sem metástase linfonodal) e N2 (quatro ou mais linfonodos positivos). Ao analisar os dados dos pacientes, verifica-se que 70% estavam no estágio N0, enquanto 30% estavam no estágio N1. Em contrapartida, ao analisar os dados dos pacientes, verifica-se que 20% apresentaram estágio MX, que indica que a presença de metástases não pode ser avaliada devido à falta de informações suficientes, 50% no estágio M0, caracterizado pela ausência de metástase à distância, significando que o câncer está confinado ao cólon ou reto e aos linfonodos regionais, sem disseminação para outros órgãos, enquanto 30% estavam no estágio M1, revelando a presença de metástase distante, sugerindo que o câncer se espalhou para locais como o fígado, os pulmões ou outros órgãos.

Tabela 1 – Estadiamento tumoral dos pacientes conforme grupo TNM.

Categoria	Subcategoria	Quantidade de pacientes (%)
T	T1	2 (20)
	T2	1 (10)
	T3	6 (60)
	T4	1 (10)
N	N0	3 (30)
	N1	7 (70)
M	MX	2 (20)
	M0	5 (50)
	M1	3 (30)

Fonte: O autor.

Os resultados obtidos para a expressão relativa do gene P2X7 [$1,35 \pm 0,9$ ($n = 10$) vs. $2,35 \pm 1,22$ ($n = 11$), em controles e pacientes, respectivamente] estão apresentados na **Figura 1**, que demonstra aumento de 1.7x da expressão do gene em linfócitos de pacientes com CCR em relação aos controles ($p < 0,05$). Os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão.

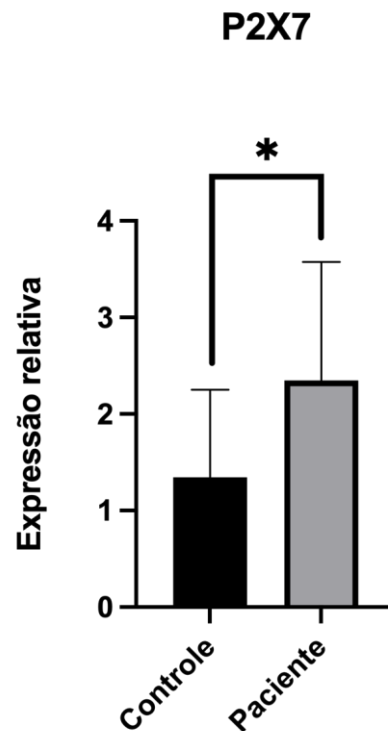


Figura 1 – Expressão gênica do receptor P2X7 em linfócitos de pacientes com CCR (n = 11) e nos controles (n = 10). Análise estatística: Teste T; *p < 0,05. Fonte: o autor (2024).

Os resultados referentes à expressão relativa do gene CD39 [$3,53 \pm$ (n = 11) vs. 1,31 (n = 12) em controles e pacientes, IC 95% 0,07 – 12,51 respectivamente] não demonstraram diferença estatisticamente significativa (p = 0,5894). Da mesma forma, os resultados obtidos para a expressão relativa do gene CD73 [1,97 (n = 8) vs. 1,19 (n = 12) em controles e pacientes, IC 95% 0 - 5,5 respectivamente] também não demonstraram diferença estatisticamente significativa (p = 0,8066) (**Figura 2**). Os dados foram apresentados na forma de mediana e IC 95%.

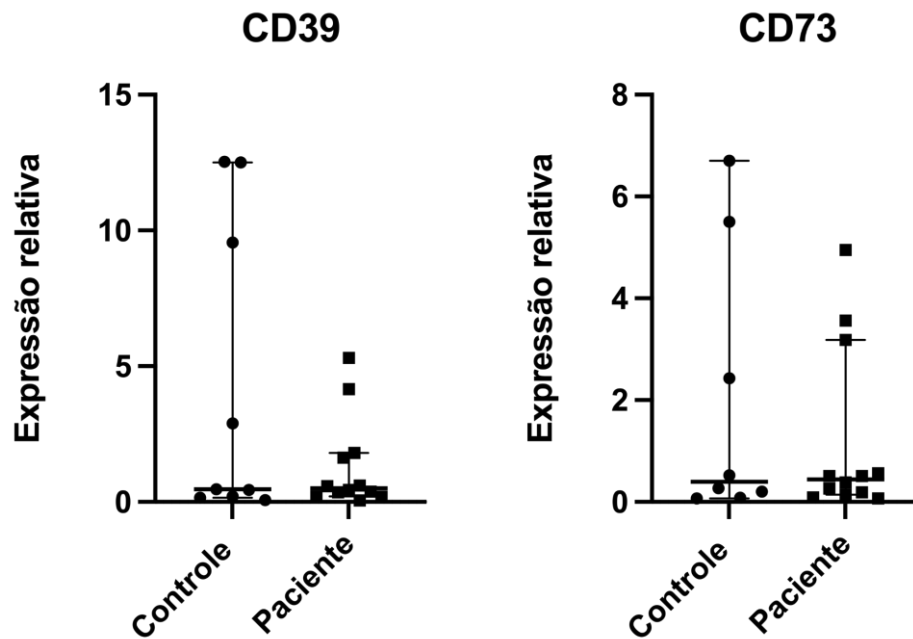
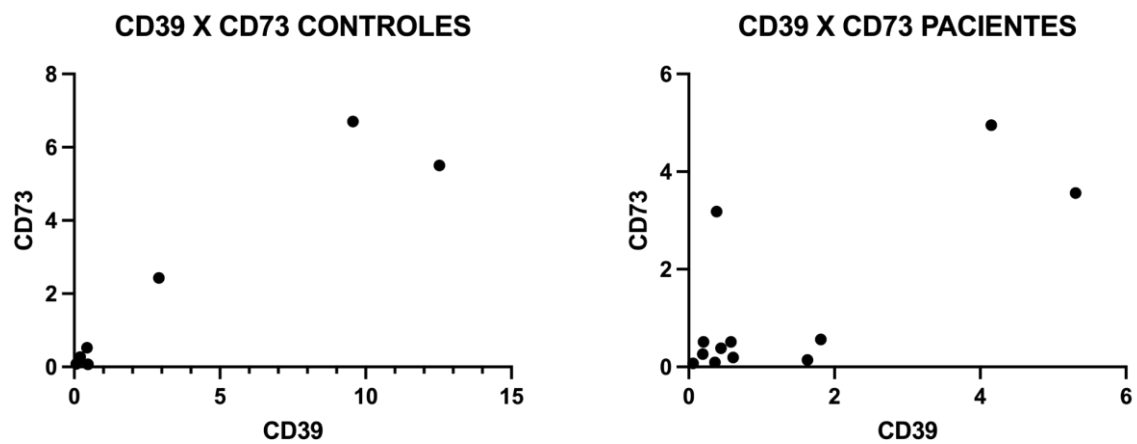


Figura 2 – Expressão gênica de CD39 e CD73 em linfócitos de pacientes com CCR ($n = 12$ e $n = 12$, respectivamente) e nos controles ($n = 11$ e $n = 8$, respectivamente). Análise estatística: Teste de Mann – Whitney; $p = 0,5894$ para CD39 e $p = 0,8066$ para CD73. Fonte: o autor (2024).

Em relação aos resultados de correlação entre a expressão dos genes CD39 e CD73, tanto nos controles ($n = 10$; $r = 0,9584$; $p < 0,0001$) quanto nos pacientes ($n = 13$; $r = 0,7577$; $p = 0,0027$) as correlações foram positivas e estatisticamente significativas (**Figura 3**).



Fonte: O autor.

Figura 3 – Análise da correlação entre a expressão dos genes CD39 e CD73 em controles (n =10) e em pacientes (n =13). Análise estatística: Teste de Pearson. Houve correlação positiva tanto no grupo controle ($r = 0,9584$; $p < 0,0001$) como nos pacientes ($r = 0,7577$; $p = 0,0027$).

DISCUSSÃO

Os linfócitos desempenham papel crucial na resposta imunológica contra o CCR. Nesse tipo de câncer, a infiltração de linfócitos no tecido tumoral é vital para uma resposta imunológica eficaz contra as células cancerígenas. No TME os linfócitos interagem com nucleotídeos e nucleosídeo de adenina presentes no fluido intersticial. Essa interação pode seguir, predominantemente, a via catalítica do ATP pelas ectonucleotidases CD39 e CD73 presentes na membrana dos linfócitos, culminando em um ambiente anti-inflamatório devido a formação de Ado. Por outro lado, o ATP pode ter maior direcionamento para a via de ligação ao receptor P2X7 presente na superfície celular, o que, por sua vez, favorece a formação de um ambiente pró-inflamatório (ROLIANO et al., 2022). É com o intuito de elucidar a interferência dos níveis – aumentados, diminuídos ou indiferentes - da expressão gênica desses elementos nos linfócitos de indivíduos com CCR que esse estudo foi delineado.

Este trabalho identificou maior expressão do gene do receptor P2X7 em linfócitos de pacientes com CCR em relação aos controles ($p < 0,05$). Esse resultado é condizente com os trabalhos que demonstram o envolvimento do P2X7R com estágios avançados de CCR, correlação com vias de disseminação metastática e alteração do metabolismo mitocondrial no sentido de obtenção de suprimento energético. Além dessas colocações, os pesquisadores também apontam para a possibilidade de categorizar o P2X7R como um hallmark do câncer e/ou um preditor de prognóstico desfavorável (QIAN et al., 2017; CALIK et al., 2020; ZHANG; DING; WANG, 2019; ADINOLFI et al., 2012).

Apesar da crescente evidência que associa o aumento da expressão e ativação do receptor P2X7 ao favorecimento de processos carcinogênicos, é natural associar sua sinalização pró inflamatória aguda – no início do combate à lesão neoplásica - como um bom preditor da resposta do hospedeiro ao tumor. De fato, a via de liberação do inflamossoma NLRP3, associada ao aumento da sinalização de IL 1 β , com conseqüente recrutamento de células TCD8+ para o TME é uma boa medida inicial contra o CCR. No entanto, é o caráter crônico da ativação do P2X7R que exerce maior associação do receptor à progressão tumoral. A cronicidade da resposta inflamatória promove fenótipos disfuncionais de células imunológicas, como células T senescentes ou “fadigadas”, incapazes de combater devidamente as células tumorais, de modo que o avanço do CCR fica cada vez mais sustentado. (RIVAS-YÁÑEZ et al., 2020; GRASSI; DE PONTE CONTI, 2021). Novamente, o conceito de “ferida que não se cura” é apropriado para justificar o caráter prolongado da ativação do P2X7R em virtude dos DAMPS decorrentes da lesão tumoral e, por conseqüência, a alteração do padrão celular e

molecular envolvendo o sistema imunológico e a neoplasia. (DEYELL; GARRIS; LAUGHNEY, 2021; ROTONDO et al., 2022).

Diferente dos achados referentes ao P2X7R, a expressão de CD39 e CD73 não apresentou diferença entre pacientes e controles ($p > 0,05$). A ausência de significância estatística na expressão de CD39 e CD73 pode ser atribuída à variabilidade e complexidade da interação entre os linfócitos, o TME e o CCR. A expressão dessas enzimas pode variar consideravelmente entre diferentes estágios do tumor, dependendo da extensão da invasão local e da presença de metástases. (D'ANTONGIOVANNI et al., 2020). De modo geral, a resposta deflagrada pela Ado quando ligada ao receptor A2A está relacionada à supressão da atividade de inúmeras células do sistema imunológico. Principalmente através da diminuição da expansão clonal de linfócitos T e supressão de outros elementos celulares e humorais pró inflamatórios (AHLMANNER et al., 2018). A constatação de sinalização pró tumoral relacionada ao eixo CD39 – CD73 é evidente e notoriamente relacionada à progressão tumoral, de modo que ensaios farmacológicos visando novas modalidades terapêuticas já vêm sendo praticadas em modelos animais tendo como alvo o antagonismo/inibição da atividade das ectonucleotidases (STAGG et al., 2011; VIJAYAN et al., 2017).

É possível buscar justificativas para esses resultados na diferença da intensidade da via da degradação do ATP em diferentes graus de avanço do CCR. Isto é, em estágios iniciais (T1 e T2), infere-se a presença limitada de células tumorais – consequentemente menor substrato de ATP para ser clivado - e a menor alteração do TME, resultando em uma expressão menos pronunciada de CD39 e CD73. Porém, à medida que o tumor progride para estágios mais avançados (T3 e T4) e ocorre disseminação para linfonodos (N1) e metástases distantes (M1), ocorre um aumento na imunossupressão para facilitar a evasão imunológica. Além disso, podemos também associar a ausência de significância estatística na diferença de expressão de CD39 e CD73 entre pacientes e controles às limitações amostrais do presente estudo.

Por fim, podemos observar a ocorrência de correlação positiva, tanto em pacientes quanto em controles, na expressão gênica de CD39 e CD73, o que reforça a íntima associação entre as duas ectonucleotidases.

Resultados prévios do grupo de pesquisa, com o mesmo grupo amostral (Veiga & Fagundes, 2023; Silverio & Lacerda, 2021) indicaram aumento da atividade das ectonucleotidases CD39 e CD73; no entanto, não observamos diferença na expressão desses genes nesse estudo atual. O menor tamanho amostral da presente pesquisa pode ter influenciado esses resultados de expressão, uma vez que não foi possível obter RNA a partir de todos os

participantes. Entretanto, o aumento da expressão de P2X7 nos pacientes ressalta a importância da via ATP-P2X7, impactando o processo inflamatório e a progressão do câncer.

5 CONCLUSÃO

É possível concluir que o receptor P2X7 está mais expresso em pacientes com CCR em relação aos indivíduos saudáveis, o que pode estar produzindo um estado favorável à progressão tumoral. Também concluímos a ocorrência de uma correlação entre a expressão de CD39 e CD73 tanto em pacientes, quanto em controles, o que aponta para o sinergismo entre essas duas ectonucleotidases. A partir deste estudo espera-se contribuir e incentivar novas pesquisas nas áreas de CCR e sistema purinérgico. Além disso, é importante ressaltar a sustentabilidade dos resultados, uma vez que foram analisados diretamente em pacientes com a neoplasia. Ademais, esta pesquisa favorece a consolidação desta área de estudo e o progresso científico, elucidando a relação entre o câncer, o sistema purinérgico e a inflamação.

REFERÊNCIAS

- ADINOLFI, Elena et al, Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo Tumor Growth, *Cancer Research*, v. 72, n. 12, p. 2957–2969, 2012.
- AHLMANNER, Filip et al, CD39+ regulatory T cells accumulate in colon adenocarcinomas and display markers of increased suppressive function, ***Oncotarget***, v. 9, n. 97, p. 36993–37007, 2018.
- ALSALMAN, Alhasan et al, Circulating and Tumor-Infiltrating Immune Checkpoint-Expressing CD8+ Treg/T Cell Subsets and Their Associations with Disease-Free Survival in Colorectal Cancer Patients, ***Cancers***, v. 14, n. 13, p. 3194, 2022.
- ANDERSON, Nicole M.; SIMON, M. Celeste. The tumor microenvironment. ***Current biology: CB***, v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020.
- ANTONIOLI, Luca et al, Inflammatory Bowel Diseases: It's Time for the Adenosine System, ***Frontiers in Immunology***, v. 11, p. 1310, 2020.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. ***CA: a cancer journal for clinicians***, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.
- BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signalling: from discovery to current developments. ***Experimental Physiology***, v. 99, n. 1, p. 16–34, 2014.
- BURNSTOCK, Geoffrey; BOEYNAEMS, Jean-Marie. Purinergic signalling and immune cells. ***Purinergic Signalling***, v. 10, n. 4, p. 529–564, 2014.
- CALIK, Ilknur et al, A promising independent prognostic biomarker in colorectal cancer: P2X7 receptor, ***International Journal of Clinical and Experimental Pathology***, v. 13, n. 2, p. 107–121, 2020.
- CEKIC, Caglar; LINDEN, Joel. Purinergic regulation of the immune system. ***Nature Reviews Immunology***, v. 16, n. 3, p. 177–192, 2016.
- COLUSSI, Dora et al. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 14, n. 8, p. 16365–16385, 2013.
- D'ANTONGIOVANNI, Vanessa et al, The Adenosine System at the Crossroads of Intestinal Inflammation and Neoplasia, ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 21, n. 14, p. 5089, 2020.
- DEAGLIO, Silvia et al, Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression, ***The Journal of Experimental Medicine***, v. 204, n. 6, p. 1257–1265, 2007.
- DEKKER, Evelien et al. Colorectal cancer. ***Lancet***, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, 2019.

DE MARCHI, Elena et al, The P2X7 receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment, **Oncogene**, v. 38, n. 19, p. 3636–3650, 2019.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, n. 3, p. 293–303, 2017.

DI VIRGILIO, Francesco. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441–5447, 2012.

DI VIRGILIO, Francesco; SARTI, Alba Clara; COUTINHO-SILVA, Robson, Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation, **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 5, p. C832–C835, 2020.

DUAN, Baojun et al, Colorectal Cancer: An Overview, in: MORGADO-DIAZ, Jose Andres (Org.), **Gastrointestinal Cancers**, Brisbane (AU): Exon Publications, 2022.

GOODEN, M J M et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 1, p. 93–103, 2011.

GRASSI, Fabio; DE PONTE CONTI, Benedetta, The P2X7 Receptor in Tumor Immunity, **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 694831, 2021.

HERNANDEZ, C.; HUEBENER, P.; SCHWABE, R. F. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. **Oncogene**, v. 35, n. 46, p. 5931–5941, 2016.

HINSHAW, Dominique C.; SHEVDE, Lalita A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 79, n. 18, p. 4557–4566, 2019.

IDOS, Gregory E. et al. The Prognostic Implications of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3360, 2020.

JACOB, Fenila et al. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 3, p. 285–306, 2013.

JANG, Tae Jung. Progressive Increase of Regulatory T Cells and Decrease of CD8+ T Cells and CD8+ T Cells/Regulatory T Cells Ratio during Colorectal Cancer Development. **Korean Journal of Pathology**, v. 47, n. 5, p. 443–451, 2013.

KANTH, Priyanka et al. Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, n. 10, p. 1509–1525, 2017.

KIM, Soon Young; KIM, Tae Il. Serrated neoplasia pathway as an alternative route of colorectal cancer carcinogenesis. **Intestinal Research**, v. 16, n. 3, p. 358–365, 2018.

LACERDA, Ângelo Pereira de; SILVERIO, Mauro Nicollas Oliveira. **Avaliação dos Constituintes do Sistema Purinérgico e Parâmetros Inflamatórios em Linfócitos de Pacientes com Adenocarcinoma Colorretal Esporádico**. Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharelado em Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2021.

LI, Jiexi et al. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. **Genes & Development**, v. 35, n. 11–12, p. 787–820, 2021.

QIAN, Fei et al, High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in colorectal cancer, **Human Pathology**, v. 64, p. 61–68, 2017.

RIVAS-YÁÑEZ, Elizabeth et al, P2X7 Receptor at the Crossroads of T Cell Fate, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4937, 2020.

ROLIANO, Gabriela Gonçalves et al, Colorectal Cancer and Purinergic Signalling: An Overview, **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4887, 2022.

ROTONDO, John Charles et al, The Role of Purinergic P2X7 Receptor in Inflammation and Cancer: Novel Molecular Insights and Clinical Applications, **Cancers**, v. 14, n. 5, p. 1116, 2022.

SCREENING for colon and rectal cancer in average-risk adults. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 4, p. 282–283, 2018.

TANG, Sha et al. Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. **International Immunopharmacology**, v. 86, p. 106700, 2020.

VEIGA, L., & LOPES, R. F. (2023). **Avaliação da Atividade de Ectonucleotidases e Marcadores Inflamatórios em Pacientes com Adenocarcinoma**. Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharelado em Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó. Chapecó, 2023.

VIJAYAN, Dipti et al, Targeting immunosuppressive adenosine in cancer, **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 12, p. 709–724, 2017.

VOGEL, Jon D. et al, The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Colon Cancer, **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 65, n. 2, p. 148–177, 2022.

VULTAGGIO-POMA, Valentina; SARTI, Alba Clara; DI VIRGILIO, Francesco. Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2496, 2020.

WAN, Mao-Lin et al. Colorectal cancer (CRC) as a multifactorial disease and its causal correlations with multiple signaling pathways. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 3, p. BSR20200265, 2020.

WERB, Zena; LU, Pengfei. The Role of Stroma in Tumor Development. **Cancer Journal**, v. 21, n. 4, p. 250–253, 2015.

WOLF, Andrew M.D. et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 4, p. 250–281, 2018.

ZAFARI, Narges et al. The role of the tumor microenvironment in colorectal cancer and the potential therapeutic approaches. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 8, p. e24585, 2022.

ZHANG, Ying; DING, Jingjing; WANG, Lili, The role of P2X7 receptor in prognosis and metastasis of colorectal cancer, **Advances in Medical Sciences**, v. 64, n. 2, p. 388–394, 2019.

APÊNDICE A – TCLE

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFFS

Prezado (a) participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: Avaliação da atividade e expressão de componentes do Sistema Purinérgico em plaquetas e linfócitos de pacientes com câncer colorretal esporádico, 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

Avaliar a atividade e expressão de componentes do Sistema Purinérgico, como enzimas e receptores, em plaquetas e linfócitos de pacientes com câncer colorretal esporádico, de modo a compreender mais profundamente as alterações fisiológicas desencadeadas pelo câncer nesses pacientes.

2. Critério de Inclusão

Pacientes: voluntários entre dezoito (18) e setenta (70) anos de idade que tenham sido diagnosticados com câncer colorretal esporádico (sem origem familiar) por coloproctologista ou oncologista, conforme CID 10, e que não tenham realizado a remoção do tumor ou iniciado tratamento farmacológico. Controles: voluntários entre dezoito (18) e setenta (70) anos de idade que não possuam patologias ativas ou 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. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa. 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. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa. A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, 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.

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. Cada participante terá um número distinto.

5. Tempo de duração da coleta/procedimento/experimento

A sua participação na pesquisa consistirá em consentir na disponibilização dos prontuários médicos (idade, sexo, subtipo patológico do tumor, estadiamento, etc) aos pesquisadores, no fornecimento de 30 ml de sangue total, cujas amostras serão congeladas para posteriores análises, e em responder aos questionários de qualidade de vida. As coletas serão realizadas pelos pesquisadores responsáveis, em ambiente adequado. O tempo de duração da entrevista e da coleta de sangue será de no máximo uma (1) hora.

6. Guarda dos dados e materiais coletados na pesquisa

As amostras e demais materiais coletados durante a pesquisa serão mantidos em arquivo, físico ou digital, por um período de cinco (5) anos. Apenas os pesquisadores e a orientadora terão acesso às amostras e demais dados. O material coletado será armazenado em armário com cadeado, na sala da pesquisadora, na UFFS. Após o período de cinco anos, todos os arquivos armazenados (físico ou digital) serão destruídos/deletados.

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

O benefício relacionado com a sua colaboração nessa pesquisa é o aprofundamento dos conhecimentos sobre a ação do Sistema Purinérgico no contexto do câncer colorretal esporádico. Dessa forma, torna-se possível progredir nos aspectos relacionados ao tratamento e, conseqüentemente, prognóstico da condição.

8. Previsão de riscos ou desconfortos

A participação na pesquisa poderá causar riscos. Um risco previsível neste caso é o desconforto no momento da coleta de sangue, em decorrência da picada da agulha. O risco será minimizado, pois 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 sintam-se confortáveis para tal. Caso os riscos previstos ocorram, você receberá tratamento e acompanhamento até que esses desconfortos desapareçam. Por exemplo, caso haja hematoma no local da coleta de sangue, você será acompanhado até que esse hematoma desapareça.

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 pôster e banner ou informativos online. Os dados pessoais dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Caso concorde em participar, concedendo amostra de sangue, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Não receberá cópia deste termo, mas apenas uma via. 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.maciell@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

Assinatura