

PUCRS

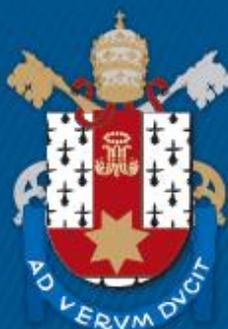
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FERNANDA VALENTE GHELER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE1 (CD39) E ECTO-
5'NUCLEOTIDASE (CD73) NO PLASMA DE PACIENTES IDOSAS COM
CÂNCER DE MAMA**

PORTO ALEGRE
JANEIRO, 2019

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Ficha Catalográfica

G412a Gheler, Fernanda Valente

Avaliação da Atividade das Enzimas NTPDase1 (CD39) e Ecto-5'Nucleotidase (CD73) no Plasma de Pacientes Idosas com Câncer de Mama / Fernanda Valente Gheler. – 2019.

92 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone.

Co-orientadora: Profa. Dra. Angelica Regina Cappelari.

1. Câncer de mama. 2. Pacientes idosas. 3. Sistema Purinérgico. 4. Ectonucleotidases. I. Morrone, Fernanda Bueno. II. Cappelari, Angelica Regina. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

FERNANDA VALENTE GHELER

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDASE1 (CD39) E
ECTO-5'NUCLEOTIDASE (CD73) NO PLASMA DE PACIENTES IDOSAS
COM CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular da
Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.

PORTO ALEGRE

JANEIRO, 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família e meu namorado, por estarem ao meu lado durante todo este período, me ajudando a atravessar mares e rios de grande correnteza para chegar à margem com segurança, dando apoio psicológico e amoroso, muitas vezes deixado em segundo plano nesse período.

Agradeço à minha orientadora, Professora Fernanda, por ter me aceitado e me guiado durante esse período e por toda minha vida acadêmica, sendo meu maior exemplo de amor à docência e me mostrando por que gosto tanto de transmitir conhecimentos.

À minha co-orientadora Angélica, que não mediu esforços para me ensinar, dar conselhos e estar sempre presente, nas horas boas e ruins. Certamente o sucesso do trabalho tem muito de ti e ele só existe graças a toda a força que me deste.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacologia Aplicada, por me receberem de braços abertos e estarem sempre prontos a compartilhar conhecimento e auxiliar no necessário. Levo todos no coração com a certeza de que não fazemos nada sozinhos, e que a melhor parte da vida são as pessoas. Vocês foram o maior presente que o mestrado me trouxe.

Finalmente, à PUCRS, à CAPES e a equipe de Oncologia do Hospital São Lucas da PUCRS por terem proporcionado a estrutura para fazer este trabalho possível.

RESUMO

O Câncer de mama é a neoplasia mais comum e a maior causa de mortalidade entre mulheres em todo o mundo, tendo forte relação com a idade. Isso é de grande importância, uma vez que o aumento da expectativa de vida da população está relacionado diretamente ao risco de (re) aparecimento da doença. Entretanto, a população idosa é frequentemente excluída de estudos clínicos e tem seus tratamentos baseados em dados obtidos da população mais jovem, o que acaba não sendo o ideal. A etiologia do câncer de mama é multifatorial, envolvendo fatores endócrinos e reprodutivos, ambientais e, em pequena proporção, predisposição familiar. A gravidade dos tumores é definida através do seu tamanho, comprometimento nodal, presença de metástases e expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona), receptores de fator de crescimento epidérmico (HER2), e a ausência de todos eles, que configura o subtipo de maior gravidade. O objetivo deste trabalho é analisar as características moleculares dos tumores nas pacientes idosas, avaliando a hidrólise dos nucleotídeos ATP a ADP e ADP a AMP, realizada pela enzima CD39, e AMP a adenosina, realizada pela CD73, como possíveis biomarcadores prognósticos e/ou alvos terapêuticos, a fim de aprimorar os desfechos da doença nesse grupo de pacientes. Foram coletadas amostras de 24 pacientes idosas (> 60 anos) do Centro de Oncologia do Hospital São Lucas da PUCRS, no momento do diagnóstico e após 6 meses de tratamento, e de 15 pacientes idosas sem diagnóstico de câncer (grupo controle). Os dados de hidrólise dos nucleotídeos das pacientes no momento do diagnóstico foram relacionados ao grupo controle, a fatores prognósticos como o índice de proliferação Ki67 e às amostras posteriores ao tratamento. A média de idade das pacientes foi de 68 anos, sendo destas, 66,6% com estágios I a II, e 33,3% com estágios III e IV, representando piores prognósticos. Os resultados demonstraram alteração na hidrólise de ADP e AMP, sendo estas menor e maior que o grupo controle, respectivamente. Com relação à comparação entre as amostras do diagnóstico e após 6 meses, houve redução significativa da hidrólise de AMP após o tratamento, ficando esta semelhante à do grupo controle, independentemente do tipo de tratamento utilizado. Na comparação com o Ki67, onde 47% apresentaram baixo índice proliferativo (Ki67 <20%), houve uma tendência dos pacientes com Ki67 alto apresentarem maior atividade AMPásica, quando comparados às amostras com Ki67 baixo. Pode-se, assim, concluir que o estudo da atividade das ectonucleotidases e o entendimento do seu papel na progressão do câncer de mama podem colaborar com a compreensão da complexidade desta doença, visando aprimorar a detecção precoce e abordagem terapêutica nas pacientes idosas.

Palavras-chave: Câncer de mama; Pacientes idosas; Sistema purinérgico; Ectonucleotidasas; CD39; CD73.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer and the biggest mortality cause among women in whole world, being strongly associated to ageing. This has a huge importance, once rise of population's life expectancy is directly related to cancer (re) appearance risk. However, elderly population is frequently excluded from clinical trials and its treatments are based in data obtained from trials with younger population, not being ideal. This cancer's etiology is multifactorial, evolving endocrine, reproductive and environmental factors and, less frequently, familiar predisposition. Tumor severity is defined by its size, node commitment, presence of metastasis, hormone receptors (estrogen and progesterone) and human epidermal growth factor receptor (HER2) expression, and the absence of all receptors, characterizing the most serious subtype. This study aimed to analyze the tumor's molecular features on elderly patients, evaluating nucleotide hydrolysis (ATP to ADP and ADP to AMP made by CD39 and AMP to adenosine by CD73) in plasma blood as possible prognostic biomarkers and/or therapeutic targets, in order to improve these patients' disease outcomes. Peripheral blood samples were collected from 24 BC patients with age above 60 years old at the moment of diagnosis and after 6 months of treatment, and from 15 elderly patients without cancer diagnosis. The nucleotide hydrolysis analysis of the samples from BC patients at diagnosis were related to control, prognostic factors, like Ki67, known as proliferation rate marker and the samples from the same patients after 6 months of treatment. The mean age of patients were 68 years old and about 66,6% with tumors stage I and II, and 33,3% staging III and IV, representing worse prognosis. Results showed BC patients had lower ADP and higher AMP hydrolysis when compared to control. When analyzing differences between the diagnose samples and the ones collected after 6 months, we were able to show a significant reduction on AMPase activity, making the profile of treated individuals look like the healthy individuals', independently of which treatment was used. When comparing the hydrolysis rate with Ki67 results, where 47% of the patients presented low rate (< 20%), there was a tendency of these ones present lower AMP hydrolysis. This way, we can conclude that understanding the ectonucleotidases activity role in cancer progression can help this disease complexity understanding, looking forward to improve early detection and therapeutic approach on elderly patients.

Keywords: Breast cancer; elderly patients; purinergic system; ectonucleotidases; CD39; CD73.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de câncer em mulheres no mundo.

Figura 2. Estadiamento do câncer de mama – T (Tumor primário)

Figura 3. Estadiamento do câncer de mama – N (Linfonodos Regionais)

Figura 4. Estadiamento do câncer de mama – M (Metástases)

Figura 5. Esquema do sistema purinérgico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Agrupamento do Sistema de Estadiamento TNM

Tabela 2 - Classificação de risco (adaptada do Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama – Ministério da Saúde)

Tabela 3. Opções de tratamento adjuvante sistêmico para mulheres com câncer de mama em estágios I, II, IIIA e IIIC Operável.

Tabela 4. Tratamento sistêmico para câncer de mama com detecção precoce por subtipo

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Adenilato ciclase

AC - Esquema quimioterapêutico composto por doxorrubicina e ciclofosfamida

ADA - Adenosina deaminase

ADO - Adenosina

ADP - Adenosina difosfato

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

ALP – Fosfatase alcalina

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

BC – *Breast Cancer*

BLS – Biópsia de Linfonodo Sentinela

BRCA - *Breast Cancer gene*

cAMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CD39 - Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase/ NTPDase/CD39

CD73 - Ecto-5'NT/CD73 - Ecto-5'-ectonucleotidase

CDI – Carcinoma ductal invasor

CLI – Carcinoma lobular invasor

CMF – Esquema quimioterapêutico composto por ciclofosfamida, metotrexato e fluoruracil

DCIS – Carcinoma ductal in situ

ePDE - ecto-fosfodiesterase

GPI - Glicosil-fosfatidilinositol

IA – Inibidores da aromatase

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IFN- γ – Interferon gama

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

kDa– Kilodalton

LCIS – Carcinoma lobular in situ

mL – Mililitros

MMG– Mamografia

NK – Células T *Natural Killers*

NPP – ectonucleotídeopirofosfatase

Ns-AP - Fosfatase alcalina não específica de tecidos

OMS - Organização Mundial da Saúde

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RE – Receptor de Estrogênio

RH – Receptores hormonais

RP – Receptor de Progesterona

TC – Esquema quimioterapêutico composto por docetaxel e ciclofosfamida

TEM – Transição Epitélio-Mesenquimal

TMX – Tamoxifeno

TNBC – *Triple Negative Breast Cancer* (Câncer de Mama Triplo Negativo)

TNM – T – descrição do tamanho do tumor primário; N – se há ou não comprometimento de linfonodal e localização destes e M – se há ou não metástases à distância.

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNBC – *Triple Negative Breast Cancer*

Tregs - Células T reguladoras

UTP – Uridina trifosfato

UDP – Uridina difosfato

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer de Mama	15
1.1.1 Epidemiologia	15
1.1.2 Tipos de Câncer de Mama	16
1.1.3 Detecção e Diagnóstico	18
1.1.4 Estadiamento do Câncer de Mama	19
1.1.5 Etiologia e tratamento	23
1.2 Câncer de mama e envelhecimento	29
1.3 Sistema purinérgico	31
1.4 Sistema purinérgico e câncer	35
2. Objetivos	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
CAPÍTULO II	41
3. ARTIGO ORIGINAL	42
CAPÍTULO III	69
4. Discussão	70
5. Considerações Finais	75
6. Perspectivas Futuras	76
CAPÍTULO IV	77
7. Anexos	78
7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	78
7.2 Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS	81
CAPÍTULO V	85
8. Referências	86

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama

1.1.1 Epidemiologia

Segundo o relatório publicado na *World Cancer Report 2014* pela Agência Internacional de Pesquisa em câncer, a IARC (do inglês - *International Agency for Research on Cancer*), filiada à Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência de câncer, em geral, aumentou de 12,7 milhões em 2008 para 14,1 milhões em 2012. Esta tendência deverá continuar, e o número de novos casos pode aumentar mais 75%, elevando o número de pacientes com a doença a aproximadamente 25 milhões nas próximas duas décadas [INCA, 2018; Globocan/Iarc, 2014]. Mais de 60% das neoplasias mundiais ocorrem na África, Ásia e nas Américas Central e do Sul, as quais apresentam cerca de 70% das mortes por tumores [Globocan/Iarc, 2014].

Entre as mulheres, os cinco tipos de neoplasias mais comuns são mama (25,2% do total), colorretal (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) [Globocan/Iarc, 2016], como mostra a Figura 1, adaptada da IARC.

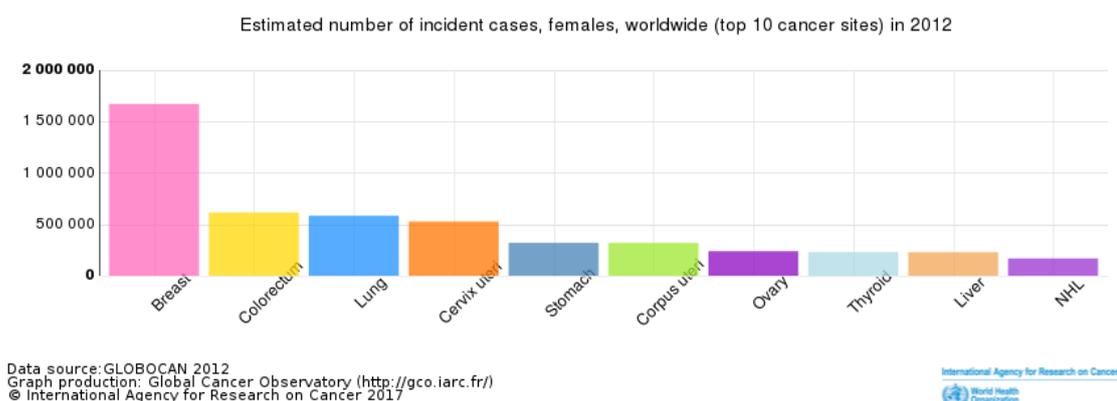


Figura 1. Incidência de Câncer em mulheres no mundo. O câncer de mama aparece como mais incidente entre mulheres, ultrapassando um milhão e meio de casos em 2012. Em seguida, aparecem câncer colorretal, pulmão, cervical, estômago, de corpo uterino, ovário, tireóide, fígado e linfoma não-Hodgkin. Adaptada de Câncer Hoje – IARC (Do inglês *Cancer Today* - IARC).

A estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o biênio 2018/2019 no Brasil é de 600 mil novos casos (excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, serão 420 mil novos casos), sendo 60 mil somente de tumores de mama, com risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. Esse tipo de neoplasia também é o mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). O Rio Grande do Sul apresentou taxa bruta de incidência de 88,23 ocorrências para cada 100 mil mulheres, sendo o câncer mais prevalente no estado, não havendo estatísticas específicas para a população idosa [INCA, 2018].

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum e a maior causa de mortalidade em mulheres no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o aprimoramento dos desfechos e da sobrevivência a esta doença através da detecção precoce permanece sendo a base da regulamentação das normas para manejo. Infelizmente, o direito à saúde, apresentado na Declaração Universal dos Direitos Humanos, acaba sendo prejudicado pela ausência generalizada de abordagens de saúde pública. Tratamentos impraticáveis, mortais e extremamente caros prejudicam o grande número de mulheres que desenvolvem câncer de mama pelo mundo [Akram *et. al*, 2017; Love *et. al*, 2004].

1.1.2 Tipos de Câncer de Mama

De acordo com a localização do tumor primário, o câncer de mama pode ser dividido em invasivo e não invasivo. O câncer de mama não invasivo é o tipo de tumor que não ultrapassa o lóbulo ou dutos onde está situado. O carcinoma ductal *in situ* (DCIS), por exemplo, ocorre quando células atípicas se desenvolvem nos dutos mamários, não se espalhando a tecidos próximos ou externos. Apesar disso, pode progredir e crescer como tumor invasivo. Além do ductal, pode ocorrer o carcinoma lobular *in situ* (LCIS), que se desenvolve nos lóbulos

mamários, não se disseminando aos demais tecidos mamários [Ministério da Saúde, 2018; NIH, 2018; Akram *et. al*, 2017].

O câncer de mama invasivo ocorre quando células anormais provenientes dos lóbulos ou dutos mamários se multiplicam próximas aos tecidos da mama. Pode ser classificado conforme a localização em carcinoma lobular infiltrante ou invasivo, medular, mucinoso e tubular. Neste tipo de câncer, as células tumorais podem se disseminar para diferentes locais do organismo através do sistema linfático ou corrente sanguínea, ocorrendo tanto no início do estabelecimento da doença, quanto em estágios mais avançados. Os tumores invasivos que atingem outros órgãos, diferentes da sua origem inicial, são reconhecidos como tumores secundários ou metastáticos. Os locais mais comuns afetados são cérebro, ossos, pulmões e fígado. Além disso, esse tipo de tumor é o de maior incidência em mulheres de até 75 anos de idade, onde a prevalência aumenta significativamente com a idade [Ministério da Saúde, 2018; NIH, 2018; Akram *et. al*, 2017].

O tipo histopatológico invasivo mais comum (observado em mais de 90% dos casos) é o carcinoma ductal infiltrante (CDI) e o segundo mais comum (em 5% a 10% dos casos), o carcinoma lobular infiltrante (CLI) [Ministério da Saúde, 2018]. Os CLI possuem maior tendência a apresentarem-se, ao diagnóstico, em ambas as mamas e com maior frequência de doença multicêntrica. A maioria deles acomete mulheres mais idosas, sua variante clássica comumente apresenta positividade para receptores hormonais (RH) e o seu prognóstico parece ser mais favorável do que o das pacientes acometidas por CDI. As pacientes com CLI podem apresentar metástases tardiamente para sítios característicos como meninge, peritônio e trato gastrointestinal [Ministério da Saúde, 2018].

O câncer de mama inflamatório apresenta-se na forma de mamas inchadas e avermelhadas, devido ao bloqueio de vasos ou canais linfáticos pelas células tumorais. É um tipo incomum e de crescimento rápido. Seu tratamento envolve acompanhamento frequente e

estratégias múltiplas de ataque, como radioterapia, quimioterapia e cirurgia [Ministério da Saúde, 2018; NIH, 2018; Akram *et. al*, 2017].

A Doença de Paget é um tipo incomum de câncer de mama que se apresenta por modificações visíveis na área dos mamilos. Seus sintomas incluem *rash* cutâneo local ou disseminado por toda a mama, afetando apenas uma das mamas, e, geralmente, inicia a partir do mamilo, o que o difere de outras condições de pele, que envolvem ambas as mamas e podem partir das aréolas. A patogênese da Doença de Paget ainda não é clara, e seus sintomas incluem sangramento e liberação de eczema pelo mamilo, aumento e inversão do mesmo, aparecimento de nódulos, e seu diagnóstico é feito por biópsia. O prognóstico é bom, se permanecer no mamilo ou dutos mamários [Ministério da Saúde, 2018; NIH, 2018; Akram *et. al*, 2017].

1.1.3 Detecção e Diagnóstico

A triagem do câncer de mama tem sido implementada em diversos países da Europa para detectar a doença em estágios iniciais e diminuir sua mortalidade. Nestes programas, a idade geralmente considerada ótima para o início do monitoramento regular é a de 50 anos, devido ao aumento da incidência da doença após esse período. Contudo, existem países e regiões que estimulam as mulheres com menos de 50 anos a serem monitoradas [Koleva-Kolarova *et. al*, 2017]. É preciso diferenciar a detecção precoce das ações de prevenção primária, pois essas têm por objetivo evitar a ocorrência da doença e suas estratégias são voltadas para a redução da exposição aos fatores de risco. Por outro lado, os métodos existentes para a detecção precoce do câncer de mama não reduzem a incidência, mas podem reduzir a mortalidade pela doença, pois os tumores em estado inicial são mais facilmente tratáveis [Ministério da Saúde, 2018; INCA, 2015].

A estratégia de diagnóstico precoce do câncer de mama mais aceita mundialmente nos últimos anos é formada pelo tripé: alerta para os sinais e sintomas suspeitos de câncer;

profissionais de saúde capacitados para avaliação dos casos suspeitos; e sistemas e serviços de saúde preparados para garantir a confirmação diagnóstica oportuna. Já o rastreamento é uma estratégia baseada na realização de testes relativamente simples em pessoas saudáveis, com o intuito de identificar doenças em sua fase pré-clínica (assintomática) [INCA, 2017]. Os melhores resultados em sobrevida em países desenvolvidos estão relacionados principalmente ao diagnóstico precoce por mamografia (MMG). Este exame é considerado um método eficaz de rastreamento populacional quando indicado nas faixas etárias e periodicidade adequada, e à evolução dos tratamentos adjuvantes. No Brasil, a conduta quanto aos riscos de as mulheres desenvolverem câncer de mama está contemplada nas diretrizes do Ministério da Saúde, para a detecção precoce. As estratégias adotadas são: o rastreamento mamográfico entre mulheres de 50 a 69 anos, a cada dois anos; e a conscientização sobre os sinais e sintomas suspeitos, com encaminhamento para serviço de diagnóstico de câncer mamário [Ministério da Saúde, 2018].

1.1.4 Estadiamento do Câncer de Mama

Além da classificação molecular, é necessário o estadiamento do tumor baseado nos fatores anatômicos do tumor primário para definição da linha de tratamento a ser seguida, que pode variar de uma mastectomia radical até terapias conservadoras [Bagaria, 2014]. Definida pelo Comitê Conjunto Americano de Câncer (Do inglês *American Joint Committee of Cancer - AJCC*), o sistema de estadiamento TNM leva em consideração o tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos (N) e a presença ou não de metástases (M) [AJCC, 2018; Bagaria, 2014; Edge, 2010]. No entanto, estudos já sugerem incorporar a categoria “B” (de biologia) ao sistema, uma vez que pacientes que são estadiados similarmente tem desfechos significativamente diferentes baseados na biologia do tumor, e o grau histológico do tumor tem mostrado valor prognóstico, mas sua reprodutibilidade é questionada quando excluído do estadiamento [AJCC 2018; Bagaria *et. al*, 2014].

O sistema de estadiamento da AJCC atualizado em janeiro de 2018 engloba tanto aspectos clínicos quanto patológicos. O estadiamento patológico (também chamado cirúrgico) é determinado pela análise do tecido removido por procedimento cirúrgico. Em alguns casos, quando a cirurgia não é possível, é realizado o estadiamento clínico, que é baseado em resultados do exame físico, biópsia e exames de imagem. O estadiamento clínico é utilizado para planejar o tratamento. Porém, em alguns casos, a disseminação do tumor ocorre além do que o exame clínico pode estimar, podendo não ter a mesma precisão do estadiamento patológico [AJCC, 2018; Sanjay *et. al*, 2014].

A classificação TNM é baseado em 7 informações fundamentais:

- Tamanho do tumor (T): Qual a extensão do câncer? Houve crescimento em áreas adjacentes? (Figura 2)
- Disseminação a linfonodos próximos (N): Houve disseminação a linfonodos próximos? Se sim, quantos linfonodos foram comprometidos? (Figura 3)
- Propagação (metástase) a sítios distantes (M): Houve propagação do tumor a órgãos distantes como fígado ou pulmões? (Figura 4)
- Receptor de Estrogênio (RE): O tumor possui receptores de estrogênio?
- Receptor de Progesterona (RP): O tumor possui receptores de progesterona?
- *HER2status*: O tumor possui expressão da proteína HER2?
- Grau tumoral (G): Qual a quantidade de células do tumor se parecem com células normais?

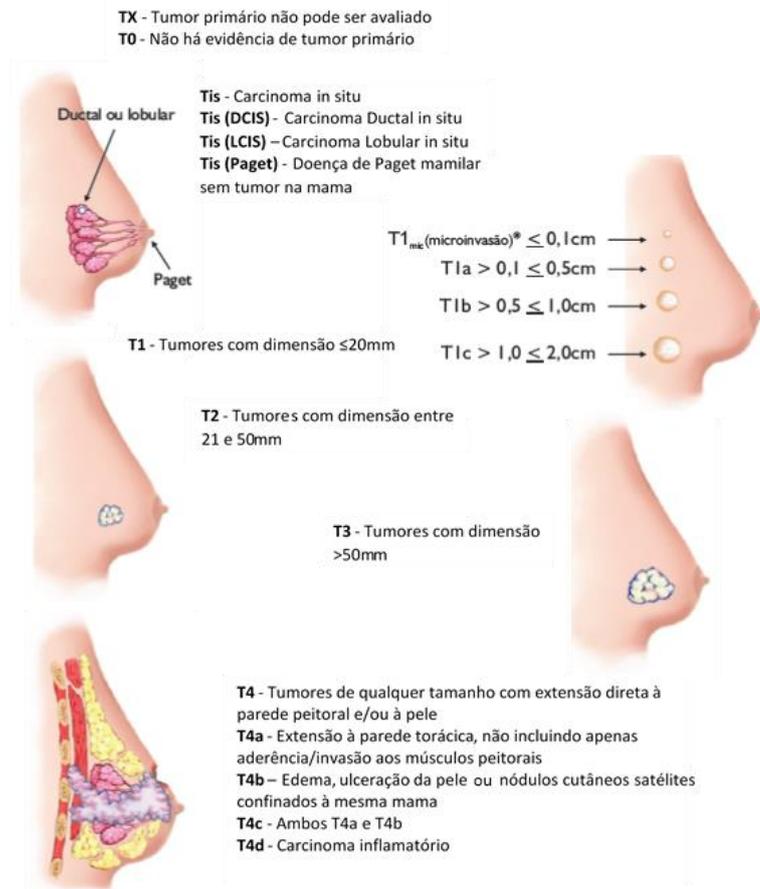


Figura 2. Representação dos aspectos avaliados no tumor primário (T) para realização do estadiamento. Neste item, leva-se em consideração o tamanho tumoral e possível invasão a tecidos adjacentes, edema e ulcerações, nódulos cutâneos e presença de inflamação. Adaptada de Classificação de Tumores Malignos da Mama – 7ª Edição – INCA.

Na Figura 4 mostra-se o último aspecto clínico a ser avaliado no Sistema TNM, a presença de metástases em órgãos distantes (M) eleva o Estágio Clínico ao nível IV, o mais crítico.

Os números ou letras após T, N e M fornecem mais detalhes desses fatores. Números mais altos significam que o câncer está em estágio mais avançado. Assim que as categorias T, N e M forem determinadas para o paciente, assim como o status de receptores (RE – receptor de estrogênio, RP – receptor de progesterona e HER2 – receptor de fator de crescimento epitelial humano 2), e o grau tumoral for determinado, as informações são combinadas em um processo chamado agrupamento de estágios, e este determina o estágio geral (Tabela 1) [AJCC, 2018; Sanjay *et. al*, 2014].

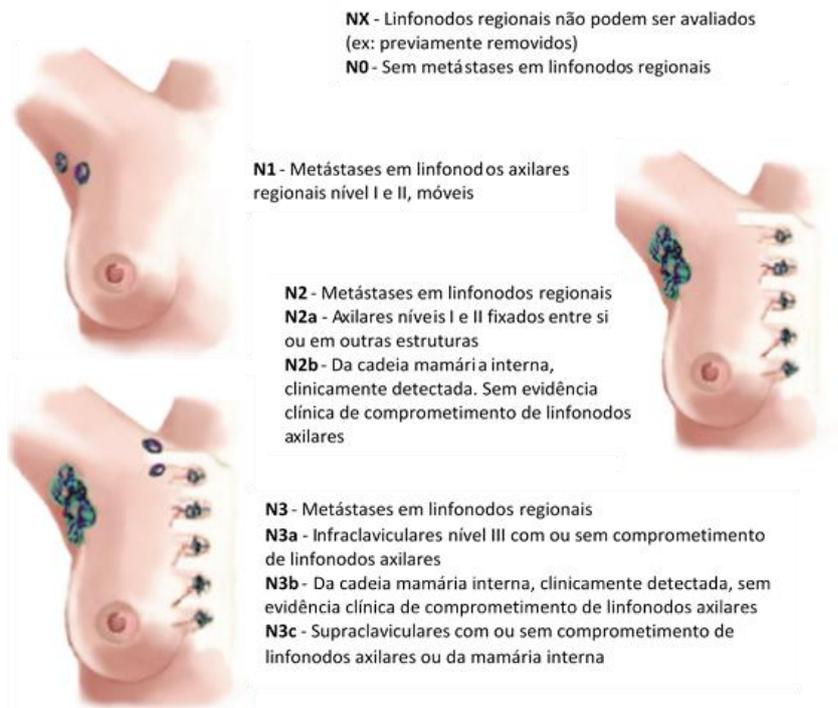


Figura 3. Aspectos avaliados com relação aos linfonodos (N) no estadiamento. Considera-se acometimento de linfonodos regionais, sendo maior o grau conforme a quantidade de linfonodos contendo células neoplásicas. Adaptada de Classificação de Tumores Malignos da Mama – 7ª Edição – INCA.

Quando T for:	E N for:	E M for:	O Grupo de Estágio é:
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Qualquer T	N3	M0	IIIC
Qualquer T	Qualquer N	M1	IV

Tabela 1. Agrupamento do Sistema de Estadiamento Anatômico para Câncer de Mama. Conforme a classificação clínica definida, o paciente é alocado no Estágio correspondente. Adaptada do Manual de Estadiamento em Câncer da AJCC, Oitava Edição.

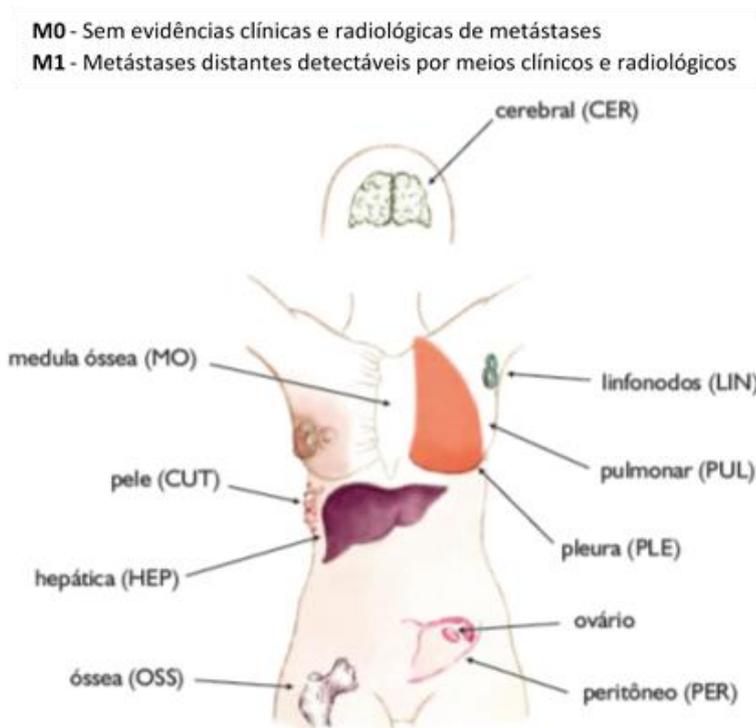


Figura 4. Último aspecto clínico a ser avaliado no Sistema TNM, a presença de metástases. Adaptado de Classificação de Tumores Malignos da Mama – 7ª Edição – INCA.

1.1.5 Etiologia e tratamento

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, envolvendo fatores endócrinos e reprodutivos (incluindo nuliparidade, primeiro parto após os 30 anos e histórico hormonal); fatores ambientais, uso de certos contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal, exposição à radiação ionizante, e fatores relacionados ao estilo de vida, como consumo de bebidas alcoólicas, dietas com alto teor calórico e falta de exercício [INCA, 2018; Globocan/Iarc, 2014].

Uma pequena proporção dos casos de câncer de mama é devida a uma predisposição familiar, onde a mutação de genes específicos aumenta os riscos de desenvolver a doença: BRCA1 e BRCA2, que codificam proteínas críticas para manutenção da integridade do DNA e estabilidade genômica (são supressoras tumorais essenciais para a divisão celular, controle de erros de replicação de DNA, reparo de DNA e apoptose) [Bianchini *et. al*, 2016]. As mutações

nestes genes aumentam muito o risco do desenvolvimento de câncer de mama, embora tais casos representem menos de 5% do total. Vários genes de penetração baixa também foram identificados, e há muitos *loci* dentro do genoma que estão ligados a um risco aumentado, mas os genes específicos ainda não foram identificados [De Souza Timoteo *et. al*, 2018; Globocan/Iarc, 2014]. No câncer de mama, a presença de mutações BRCA1 é caracterizada pelo fenótipo *basal-like*, RE negativo, superexpressão de receptores de fator de crescimento epidérmico, amplificação de genes MYC (família de codificadores de fatores de transcrição), mutações no TP53 (gene que codifica a proteína p53, supressora tumoral), extrema instabilidade genômica e sensibilidade a agentes de reticulação de DNA [Bianchini *et. al*, 2016].

Os tipos de câncer de mama caracterizados pela amplificação de marcadores específicos ou receptores hormonais, como o RE e o RP, são os tipos mais frequentes - aproximadamente 70% dos casos são RE+ e/ou RP+. Para as mulheres com RH positivos, as opções de tratamento hormonal adjuvante são o tamoxifeno (TMX) na dose de 20 mg por dia, indicado nos casos de mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa, ou um inibidor da aromatase (IA), que é indicado apenas para mulheres pós-menopáusicas (Tabela 2). Os IA incluem o anastrozol (1 mg/dia), letrozol (2,5 mg/dia) e exemestano (25 mg/dia). A quimioterapia adjuvante está indicada em pacientes com tumores de risco intermediário e alto [Ministério da Saúde, 2018].

A amplificação do HER2, um potente oncogene responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembrana com atividade de tirosinoquinase intracelular, fundamental para a ativação de vias de sinalização associadas à proliferação e diferenciação celulares e possivelmente de mecanismos de controle da angiogênese [Ministério da Saúde, 2018], define um segundo tipo, cuja incidência é de, aproximadamente, 20%. Este é responsivo à terapia anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab e TDM1) e pode, ainda, ter ou não receptores hormonais positivos, e neste caso, utiliza-se a associação à terapia endócrina (tamoxifeno/anti-HER2 ou AI/anti-HER2). É estimado que aproximadamente 50% das pacientes com câncer de

mama metastático HER2+ não respondem à terapia específica anti-HER2[NIH, 2018]. A ativação anormal da via de sinalização PI3K-Akt causada por mutações no gene PI3KCA podem promover resistência ao trastuzumab [Jiang et. al, 2018]. Além do aumento gradual na resistência, outros aspectos importantes são os efeitos adversos, como cardiomiopatia, que afeta 2,8 a 3,3% das pacientes. Quando administrado em associação a antraciclina, pode causar disfunção cardíaca, como diminuição da fração de ejeção ventricular e insuficiência cardíaca congestiva, que afeta aproximadamente um quarto das pacientes [Jiang et. al, 2018].

Grupos de Pacientes	Opções de Tratamento
Pré-menopausicas, Receptores hormonais positivos (RE ou RP)	Sem tratamento adicional
	Tamoxifeno
	Tamoxifeno + quimioterapia
	Supressão Ovariana + Tamoxifeno
	Supressão Ovariana + inibidor da aromatase
Pré-menopausicas, Receptores hormonais negativos (RE ou RP)	Sem tratamento adicional
	Quimioterapia
Pós-menopausicas, Receptores hormonais positivos (RE ou RP)	Sem tratamento adicional
	Inicial com Inibidores da aromatase ou tamoxifeno seguido de inibidor da aromatase com ou sem quimioterapia.
Pós-menopausicas, Receptores hormonais negativos (RE ou RP)	Sem tratamento adicional
	Quimioterapia

Tabela 2. Opções de tratamento adjuvante sistêmico para mulheres com câncer de mama em estágios I, II, IIIA e IIIC Operável, divididas em grupos conforme estado menopausal e presença ou ausência de RH. Adaptada de Tratamento do Câncer de Mama (PDQ®) – Versão do Profissional da Saúde. Instituto Nacional do Câncer, dos Institutos Nacionais de Saúde.

Os casos restantes são do tipo triplo negativo, que é descrito como a deficiência de RP, HER2 e expressão de RE. Esse tipo é predominantemente destrutivo, comumente observado em mulheres pós-menopáusicas, e responsável por 10 a 15% dos casos em mulheres de etnia branca [Akram et. al, 2017]. Tem comportamento clínico heterogêneo, relacionado a piores prognósticos, quando comparado a outros subtipos de câncer de mama. É agressivo e possui poucos alvos moleculares reconhecidos para tratamento [Bianchini et. al, 2016]. Para a decisão terapêutica, deve-se considerar os estadiamento pela classificação TNM, laudo histopatológico,

resultado do exame de IHQ, quadro clínico e tratamento local porventura já realizado [Ministério da Saúde, 2018].

A partir dos critérios de risco de recorrência, pode-se classificar o câncer de mama como de baixo, intermediário e alto risco (Tabela 3), conforme consenso de especialistas em Saint Gallen, em 2013. Esta classificação auxilia na indicação de quimioterapia adjuvante; quanto maior o risco de recorrência, maior deverá ser o benefício do tratamento [Ministério da Saúde, 2018].

Em comparação com as mulheres mais jovens, as mais velhas (acima de 65 anos) são mais propensas a ter câncer de mama com expressão de RE e RP, porém com menor expressão de HER2 [Tesarova, 2016] - os cânceres RE+ ultrapassam a taxa de 60% entre as mulheres de 30 a 34 anos e 85% entre as mulheres de 80 a 84 anos. Os tumores HER2+ diminuem de 22% entre as mulheres com menos de 40 anos para 10% em mulheres com 70 anos ou mais, e estão associados com piores desfechos. O tamanho do tumor e o envolvimento nodal aumentam com a idade, podendo ser explicado pelo diagnóstico tardio em mulheres mais velhas. No entanto, o aumento do envolvimento nodal é visto principalmente em tumores menores, sugerindo tumores pequenos mais agressivos em mulheres com maior idade [Tesarova, 2016; Biganzoli *et. al*, 2012; IBCSG, 2006].

A decisão de tratamento adjuvante sistêmico deve ser baseada na sensibilidade de predição a tipos de tratamento particulares, o benefício do uso e o risco individual de recidiva. A decisão final também deve levar em consideração as sequelas, idade biológica do paciente, estado de saúde geral, comorbidades e preferências. O tratamento deve iniciar preferencialmente entre 2 a 6 semanas após a cirurgia e geralmente é administrado por 12 a 24 semanas (quatro a oito ciclos), dependendo do risco de recidiva individual e o esquema selecionado [NIH, 2018; Senkus *et. al*, 2015].

A quimioterapia é recomendada na vasta maioria de tumores triplo negativo, HER2 positivos e HER2 negativos de alto risco. O benefício absoluto do tratamento quimioterápico é mais pronunciado em tumores RE negativos. Em RE positivos, seu benefício se dá pela indução da supressão ovariana.

Baixo Risco	Linfonodo negativo e todos os seguintes critérios: - pT até 2 cm, - Grau 1, - RE ou RP positivo, - HER-2 negativo, - Subtipo molecular luminal A - Idade igual ou acima de 35 anos.
Risco Intermediário	Linfonodo negativo e pelo menos um dos seguintes critérios - pT maior que 2 cm, - Grau 2 - 3, - RE ou RP negativos, - Subtipo Molecular Luminal B (HER-2 negativo), - Idade abaixo de 35 anos ou - 1 a 3 linfonodos positivos se RH positivo.
Alto Risco	- 4 ou mais linfonodos positivos ou - Linfonodo negativo com RE e RP negativos, T maior que 2 cm e HER-2 negativo ou - Linfonodo negativo, T maior que 1cm e HER-2 positivo

Tabela 3. Classificação de Risco de Câncer de Mama, conforme características do paciente e aspectos clínicos e moleculares do tumor. Adaptado das Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama – Ministério da Saúde.

Os esquemas mais frequentemente utilizados contêm antraciclina e/ou taxanos, apesar de o esquema CMF (ciclofosfamida, metotrexato e fluoruracil) ainda ser utilizado em alguns pacientes. Quatro ciclos de doxorrubina e ciclofosfamida (AC) são considerados equivalentes a seis ciclos de CMF [Ministério da Saúde, 2018; NIH, 2018; Senkus *et. al*, 2015].

A adição dos taxanos ao tratamento melhora a eficácia da quimioterapia independente de idade, status nodal, tamanho e grau tumoral, expressão de receptores hormonais ou uso de tamoxifeno, mas ao custo de aumento de toxicidade não-cardíaca. No geral, os esquemas baseados em antraciclina e taxanos reduzem a mortalidade por câncer de mama em até um terço. Esquemas baseados em taxanos sem antraciclina, como quatro ciclos de docetaxel e

ciclofosfamida (TC) podem ser utilizados como alternativa em pacientes com risco de complicações cardíacas [Ministério da Saúde, 2018; NIH, 2018; Senkus *et. al*, 2015].

A poliquimioterapia deve ser utilizada em pacientes com doença rapidamente progressiva que necessitem de resposta objetiva rápida, a despeito da maior toxicidade proporcionada por esse tratamento. Fora destas condições, pacientes devem ser submetidos à monoterapia [Ministério da Saúde, 2018]. Ainda, os tumores com detecção precoce podem sofrer intervenção cirúrgica conservadora ou mastectomia radical com ou sem reconstrução mamária e biópsia de linfonodo sentinela (BLS), podendo receber radiação pós-operatória conforme necessidade [NIH, 2018]. A tabela 4 apresenta um resumo dos tratamentos a serem realizados de acordo com o subtipo tumoral, conforme descrito anteriormente.

Subtipo	Terapia	Observações
Luminal-A like	Terapia endócrina é a intervenção mais grave e geralmente é utilizada isolada.	Citotóxicos devem ser adicionados em pacientes específicos. Indicados para pacientes: <ul style="list-style-type: none"> • Doença grau 3 • Envolvimento de 4 ou mais linfonodos
Luminal-B like	HER2-: Terapia endócrina para todos os pacientes; terapia citotóxica para a maioria deles	
	HER2+: Citotóxicos + anti-HER2 + terapia endócrina	Sem dados disponíveis para sustentar a omissão de citotóxicos nesse grupo.
HER2 Positivo	Citotóxicos + anti-HER2	
Triplo Negativo	Citotóxicos	
Tipos Histológicos Específicos*	Endócrino-responsivos: Terapia Endócrina	
	Endócrino não-responsivos: Citotóxicos	

Tabela 4. Recomendações de tratamento sistêmico para Câncer de Mama por Subtipo. *Tipos Histológicos Específicos: Endócrino-responsivos (cribriforme, tubular e mucinoso); Endócrino não-responsivos (apócrino, medular, adenoide cístico e metaplástico). Adaptada de Personalizando o tratamento de mulheres com câncer de mama em estágio inicial: destaques do Consenso Internacional de Experts no Terapia Primária para Câncer de Mama em Estágios Iniciais 2013 (Do inglês *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*).

1.2 Câncer de mama e envelhecimento

O câncer tem uma forte relação com a idade. Até 50% das mulheres com câncer de mama tem mais de 65 anos no momento do diagnóstico [Gal *et. al*, 2017]. As taxas na faixa etária mais jovem (0-14 anos) são cerca de 10/100.000, aumentando para 150/100.000 em idade entre 40 e 44 anos e para mais de 500/100.000 em idade entre 60 e 64 anos [Globocan/Iarc, 2014]. Ao longo dos anos, a expectativa de vida tem aumentado e como resultado de uma população cada vez mais longeva, o risco de (re) aparecimento dos tumores deve ser um ponto importante a ser considerado [Barginear *et. al*, 2014], uma vez que a recidiva e a metástase são as principais causas de mortalidade desses pacientes [Yu *et. al*, 2017].

Apesar de os tumores de mama em idosas serem de características biológicas mais favoráveis que as pacientes mais jovens, quando se trata de status de receptores hormonais, grau e taxa de proliferação, as pacientes idosas geralmente são diagnosticadas em estágio mais avançado. Além disto, essas pacientes são “sub-tratadas”, em parte devido a preocupações dos médicos a respeito das comorbidades e a escolha apropriada de terapia médica e cirúrgica [Gal *et. al*, 2017; Tesarova, 2016].

As recomendações para o tratamento do câncer de mama em indivíduos mais velhos são limitadas pela falta de evidência de nível 1 (estudos com evidências científicas e forte força de recomendação). O tratamento é amplamente baseado em análises retrospectivas de subgrupos, limitadas a extrapolação de resultados de estudos com pacientes mais jovens. Essa extrapolação pode não ser válida, uma vez que a diferença das características biológicas do câncer de mama em pacientes idosos e a tolerância ao tratamento variam, além de existirem outros riscos de mortalidade [Tesarova, 2016; Turner *et. al*, 2013; Biganzoli *et. al*, 2012].

As pacientes idosas têm maior risco de apresentar efeitos adversos relacionados à quimioterapia por alterações fisiológicas, que podem contribuir para diminuição da tolerância ao tratamento. Com o avançar da idade, o percentual de água corporal diminui, levando a

diminuição do volume de distribuição de medicamentos hidrossolúveis, e a gordura corporal aumenta, modificando a distribuição de drogas lipossolúveis. Além disto, a diminuição do *clearance* de creatinina geralmente leva à diminuição da velocidade de eliminação de drogas excretadas via renal. Assim, percebe-se que a idade está associada à redução da tolerância tecidual à quimioterapia, fazendo com que estes pacientes estejam mais suscetíveis a toxicidade hematológica e não-hematológica, incluindo toxicidade cardíaca e neurológica [Turner *et. al*, 2013].

A sobrevivência relativa de 5 e 10 anos de pacientes com 70 anos ou mais é menor que a dos pacientes com idade entre 40-70 anos, mesmo quando é analisado o estágio da doença. Estudos realizados em hospitais públicos australianos mostraram redução na sobrevivência de 5 anos, sendo de 86% em pacientes com 70 a 79 anos e 76% para pacientes acima de 80 anos, comparado a 92% dos casos diagnosticados com menos de 70 anos [Roder *et. al*, 2017]. O tratamento insuficiente, as diferenças socioeconômicas e o acesso desigual aos cuidados de saúde contribuem para o pior prognóstico em países mais pobres [Globocan/Iarc, 2014; Biganzoli *et. al*, 2012].

1.3 Sistema purinérgico

Nucleotídeos de purinas e pirimidinas (ATP, ADP, UTP e UDP) e nucleosídeos, como adenosina (ADO), são moléculas fundamentais que agem como blocos de construção, moduladores intracelulares e fornecedores de energia, necessários para a sobrevivência celular. Uma característica importante de nucleotídeos e nucleosídeos é sua habilidade de desenvolver atividades no meio extracelular, onde podem ser liberados, metabolizados e transportados de diferentes formas, tanto em condições fisiológicas quanto em patológicas [Santos *et. al*, 2016; Ferrari *et. al*, 2017]. De um modo geral, as purinas caracterizam-se como poderosos mensageiros extracelulares para células não neuronais, incluindo células secretoras, exócrinas

e endócrinas, endoteliais, imunes, músculo-esqueléticas e inflamatórias. A sinalização purinérgica é rápida na neurotransmissão, neuromodulação e secreção, mas também é eficiente a longo prazo na proliferação, diferenciação, migração e no desenvolvimento da morte e regeneração [Burnstock, 2017].

Em condições patológicas a liberação exacerbada, não apenas de ATP, mas também de UTP e UDP, é causada por diferentes agentes estressores, como danos à membrana plasmática, intoxicação por toxinas bacterianas, agregação plaquetária, como consequência de infecção viral ou bacteriana, estresse mecânico ou contato de alérgenos. Nesses casos, o ATP funciona como um sinal, alertando e/ou ativando, de modo autócrino/parácrino as células imunes próximas para combater microrganismos, iniciar respostas de reparo tecidual ou localizar e engolfar células apoptóticas [Allard *et. al*, 2017; Ferrari *et. al*, 2017].

O ATP desencadeia suas funções através da ligação aos receptores P2 que são classificados como ionotrópicos (P2X 1 a 7) ou metabotrópicos (P2Y 1, 2, 4, 6 e 11 a 14). Além disso, apresentam ampla seletividade por nucleotídeos e desencadeiam diferentes vias de sinalização intracelular. Receptores P2X são canais catiônicos ativados pelo ATP extracelular e seletivos para cátions mono e divalentes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}). Já os P2Y são receptores de membrana ligados à proteína G e demonstram heterogenicidade no acoplamento à proteína G, especificidade ao agonista e sinalização intracelular. P2Y1, P2Y12, e P2Y13 são preferencialmente ativados por ADP, enquanto que UDP é agonista de P2Y6. P2Y2, P2Y4, e P2Y6 são ativados por UTP, e P2Y11 (assim como P2Y1 e P2Y2) é ativado por ATP. O receptor P2Y14 é ativado por açúcares de UDP, como UDP-glicose. As ações biológicas da ADO são mediadas por quatro receptores ligados à proteína G (P1), agrupados em quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B}, e A₃[Santos *et. al*, 2016; Ferrari *et. al*, 2017; Namasivayam *et. al*, 2017].

Todas as moléculas mensageiras extracelulares devem ser degradadas rapidamente para prevenir a superestimulação de células alvo e dessensibilização de receptores [Di Virgilio *et.*

al, 2018]. Uma vez no meio extracelular, ATP e ADP são hidrolisados a AMP pelas ectonucleotidases expressas em membranas plasmáticas. Esta família de enzimas pode ser classificada em três subgrupos: as ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases (NTPDases), ectonucleotídeopirofosfatase/fosfodiesterases (NPPs) e a fosfatase alcalina (ALP). O AMP formado é eficientemente degradado a adenosina (ADO) pela ecto-5'-nucleotidase/CD73 [Di Virgilio *et. al*, 2018; Al-Rashida *et. al*, 2015](Figura 5). A ADO extracelular é eventualmente transformada em inosina pela enzima adenosina deaminase (ADA/CD26). Tanto a ADO como a inosina (INO) podem exercer funções celulares através da ativação dos receptores P1 [Santos *et. al*, 2016; Ferrari *et. al*, 2017].

Os membros da família das NTPDases são proteínas altamente glicosiladas com massa molecular entre 70 e 80 kDa, que compartilham sequências homólogas, em particular as “regiões de apirase conservadas” e consistem em dois domínios transmembrana no N- e C-terminais com um grande loop extracelular contendo uma região central hidrofóbica [Yegutkin *et. al*, 2014]. Entre as NTPDases, quatro estão localizadas na membrana plasmática e exibem seu sítio catalítico voltado para o espaço extracelular - as NTPDases 1, 2, 3 e 8. As NTPDases 5 e 6 estão localizadas dentro das células e são secretadas por expressão heteróloga; as NTPDases 4 e 7 também são intracelulares, porém seu sítio ativo apresenta-se voltado para o lúmen das organelas citoplasmáticas. Essas NTPDases diferem entre si devido a suas propriedades catalíticas: enquanto a NTPDase 1 hidrolisa ATP e ADP na razão de 1:1, as NTPDases 3 e 8 tem o ATP como substrato preferencial (razão 3:1). A NTPDase 2 hidrolisa majoritariamente ATP em uma razão 30:1, sendo então classificada como uma ecto-ATPase [Robson *et. al*, 2006].

A enzima CD39, membro da família das NTPDases, controla a cascata de catalisação do ATP em ADP, e o ADP em AMP, e este, por sua vez, é convertido em ADO pela CD73. A adenosina extracelular gerada tem tempo de meia vida muito curto (alguns segundos) e pode

ser catabolizada a inosina, ou pode ser recaptada por transportadores que controlam a concentração e o equilíbrio de nucleosídeos, ou ainda, ativar os receptores P1 [Allard *et. al*, 2017]. A ecto-5'-nucleotidase ou CD73 é uma metaloenzima por apresentar em sua estrutura um átomo de zinco. Encontra-se extracelularmente ligada à membrana plasmática pela porção C-terminal, através de uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI). Adicionalmente, possui conformação ativa formada por duas subunidades de glicoproteínas conectadas por uma ponte dissulfídeo, com massa molecular total aparente de 60 a 80 kDa [Yegutkin *et. al*, 2014].

Além destas enzimas, as fosfatases alcalinas de mamíferos são enzimas ubíquas típicas, que compreendem proteínas homo e heterodiméricas, com subunidades de aproximadamente 80kDa, ligadas à membrana plasmática também por ancoragem ao GPI. Cada sítio catalítico possui dois íons de Zn^{2+} e um de Mg^{2+} , necessários para sua atividade. Esta enzima possui larga especificidade a substratos de diferentes fosfomonoésteres e outros compostos contendo fosfato, incluindo nucleotídeos de adenina, fosfato inorgânico, pirofosfato, β -glicerofosfato, fosfatos de glicose, com liberação de fosfato inorgânico e com pH ótimo para a atividade catalítica na faixa alcalina de 8 a 11 [Yegutkin *et. al*, 2014; Robson *et. al*, 2006].

Assim como as fosfatases alcalinas, as fosfodiesterases (NPPs) possuem pH ótimo entre 8,5 e 9, pertencendo ao grupo das fosfodiesterases alcalinas. A NPP1 é uma glicoproteína de membrana que também existe como enzima solúvel, e utiliza tanto nucleotídeos púricos quanto pirimídicos como substratos. Além disso, o cAMP, um segundo mensageiro intracelular formado a partir do ATP pela adenilatociclase, pode ser liberado pelas células e hidrolisado pela NPP1, liberando AMP. A partir do AMP gerado, a CD73 promove a formação de adenosina, finalizando a cascata de hidrólise. O bloqueio da NPP1 pode reduzir a produção extracelular dessa molécula, através da redução de seu precursor AMP [Namasivayam *et. al*, 2017]. Por fim, a ADA1 (usualmente citada como ADA) catalisa a desaminação irreversível de adenosina em inosina e é amplamente expressa no intestino, timo, baço e outros tecidos

linfóides e não-linfóides. Além de sua localização citosólica, a ADA também pode ser expressa como ectoenzima na superfície de linfócitos, células dendríticas e outros tecidos, e também como enzima solúvel circulante no soro humano [Yegutkin *et. al.*, 2014].

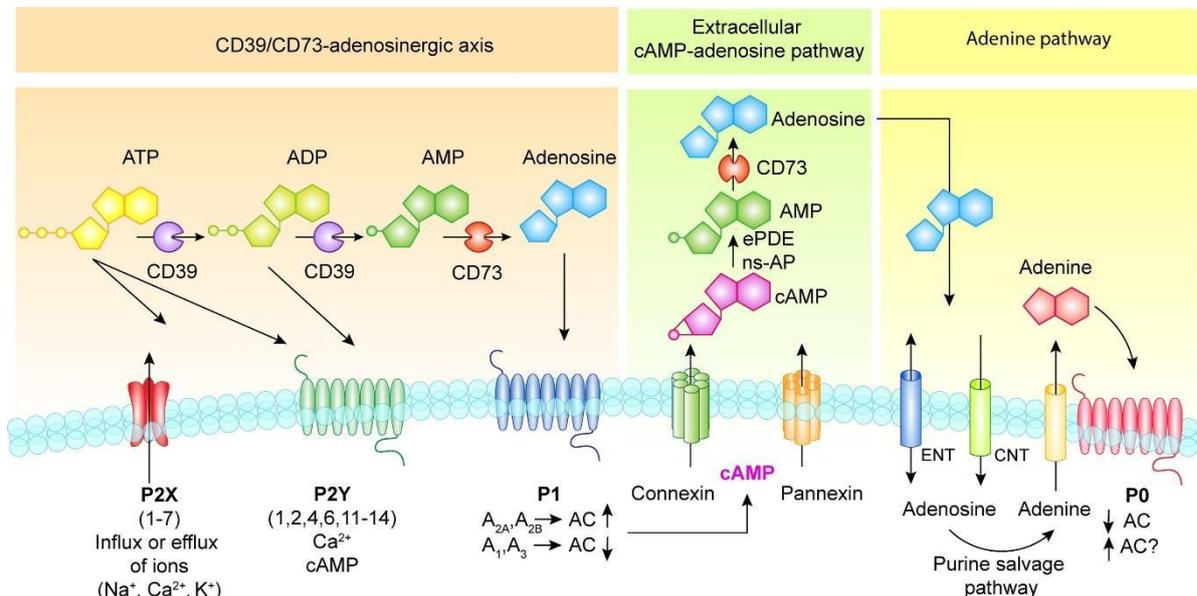


FIGURA 5: Esquema dos elementos básicos da Sinalização Purinérgica. O ATP ativa diferentes receptores P2X ionotrópicos e/ou P2Y metabotrópicos, levando a modificações nas concentrações iônicas e de cAMP intracelulares. As Ecto-nucleotidasas (CD39, ENPP e CD73) hidrolisam ATP, gerando ADP, AMP e adenosina. Uma vez no meio extracelular, a adenosina estimula receptores P1 para aumentar o Ca²⁺ citosólico e/ou a concentração de cAMP. O cAMP pode ser liberado através de hemicanais de conexina ou canais de panexina. No meio extracelular, cAMP pode ser convertido a AMP e adenosina pela ecto-fosfodiesterase (ePDE), ou pela fosfatase alcalina não específica de tecidos (ns-AP). Finalmente, a adenina intracelular gerada a partir da adenosina na via de salvagem de purinas, é liberada por transportadores nucleosídicos. A adenina extracelular se liga a receptores ligados a proteína G P0, que inibem a atividade da adenilato ciclase (AC). [Adaptado de Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F, 2018]

1.4 Sistema purinérgico e câncer

O câncer tem a capacidade de crescer subvertendo as vias de supressão imunológica, prevenindo que as células malignas sejam reconhecidas como perigosas ou estranhas. Esse mecanismo faz com que o câncer não seja eliminado pelo sistema imune e permite a progressão da doença de um estágio inicial a um estágio letal [Allard *et. al.*, 2017].

Um dos pontos cruciais para o entendimento das interações tumor-hospedeiro é a composição bioquímica do microambiente tumoral. Recentemente foi demonstrada a existência de altas concentrações de ATP extracelular (na faixa de centenas de micromolares) em tumores, mas não em tecidos saudáveis. Dessa forma, o microambiente tumoral se torna um sítio ativo

de liberação/geração de ATP e conversão em adenosina, produzindo um meio rico em fatores de crescimento e imunomoduladores. Não surpreendentemente, o microambiente anti-inflamatório também é rico em ATP extracelular [Burnstock *et. al.*, 2013; Wilhelm *et. al.*, 2010] e a adenosina pode agir como inibidora da ativação de células NK [Burnstock *et. al.*, 2013; Hoskin *et. al.*, 1994]. Estudos *in vivo* demonstraram que o meio extracelular de tumores sólidos apresenta alta concentração de adenosina, gerada pela ação conjunta das ectonucleotidases CD39 e CD73 [Burnstock *et. al.*, 2013; Ohta *et. al.*, 2006]. Devido à ação imunossupressora da adenosina, estes achados dão uma pista crucial para o entendimento das estratégias de evasão do sistema imune pelo câncer e a participação do sistema purinérgico nesse processo.

A inibição do crescimento de células de câncer de mama humano por ATP foi mostrada pela primeira vez em 1993 por Spungin e Friedberg. A liberação de ATP por células tumorais de mama de camundongos causada por quimioterapia aumentou a regressão tumoral através da apoptose e sugeriu-se que os receptores P2Y2 e/ou P2Y4 estavam envolvidos. O estrogênio, atuando através do receptor de estrogênio α , promove a proliferação de células de câncer de mama através da regulação negativa do receptor P2Y2, impedindo o aumento de cálcio iônico induzido por este receptor. Além disto, as células malignas de carcinoma mamário liberam ATP tornando o ambiente pré-metastático adequado para micro-metástases em linfonodos e vasos linfáticos aferentes associados [Burnstock, 2017].

Os efeitos anti-inflamatórios da CD39 ocorrem através de dois diferentes mecanismos: pela remoção do ATP que provoca efeitos pró-inflamatórios no meio extracelular ou pela geração concomitante de adenosina, que age como imunossupressor. Sua expressão é aumentada em linfócitos T ativados, indicando o importante papel que essa enzima tem na modulação imune e na resposta inflamatória. A inflamação age em todos os estágios da tumorigênese – em estágios iniciais, cria um microambiente favorável que estimula mutações,

instabilidade genômica e modificações epigenéticas; na progressão tumoral, estimula angiogênese, escape imune e crescimento do câncer [Rockenbach *et. al*, 2013].

Becker *et. al* (2018) demonstraram que, quando há aumento do ATP extracelular, há um aumento na atividade da CD39 como mecanismo compensatório a fim de auxiliar no controle da inflamação em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, atenuando os efeitos inflamatórios e reestabelecendo um balanço. Além disso, a expressão de CD39 por células endoteliais do fígado, por exemplo, pode proteger diretamente as células de hepatocarcinomas dos altos níveis de ATP extracelular, o que limitaria diretamente o crescimento tumoral. Esses efeitos antitumorais podem ser atenuados pela provisão da CD39 ou expressão intrínseca da enzima nessas células [Cai, 2016]. Sendo assim, a utilização de inibidores ou anticorpos bloqueadores de CD39 poderiam representar uma estratégia para manter a imunossupressão mediada por células sob controle, uma vez que a mesma afeta diretamente este mecanismo [Allard *et. al*, 2017].

De acordo com dados bioquímicos, as formas solúveis das enzimas pertencentes à família das NTPDases perderiam toda a atividade catalítica circulando livres no plasma. Há evidências, no entanto, de que as NTPDases podem ser encontradas cataliticamente ativas, sobre a superfície de microvesículas formadas a partir de fragmentos de membrana plasmática que podem ser liberados por diferentes tipos celulares, incluindo diversos tipos tumorais [Jiang *et. al*, 2014; Zimmermann *et. al*, 2012].

Além das funções citadas anteriormente, existem evidências de que o papel da CD39 vai além de efeitos benéficos para o câncer. A hipótese purinérgica desenvolvida pelo nosso grupo de estudos, no caso dos gliomas, é a de que eles provocam a liberação de glutamato, o que acarreta na necrose do tecido normal e liberação de ATP, e ampliação do espaço para o crescimento do próprio tumor. Porém, estas células têm capacidade extremamente reduzida de hidrolisar ATP, e o acúmulo desse ATP no meio extracelular estimula a proliferação destas

células [Wink *et. al*, 2003; Morrone *et. al*, 2003]. Na tentativa de reduzir a concentração neurotóxica desse nucleotídeo, a CD39 expressa pelos astrócitos converte o ATP até AMP, promovendo a proteção das células normais [Wink *et. al*, 2005]. O AMP é convertido em ADO pelas células do glioma, que expressam CD73 e a utiliza para produzir micro metástases cerebrais e adenosina, que age como um fator proliferativo ao tumor [Bavaresco *et. al*, 2008].

Já foi descrito que a enzima CD73 é altamente expressa na maioria dos tumores sólidos, sendo proposta como um potencial biomarcador clínico ou prognóstico [Dietrich *et. al*, 2017], além de ser considerada a principal produtora de adenosina extracelular [Spsychala, 2000]. Além disto, está positivamente envolvida com progressão, invasão, migração e adesão tumoral, assim como se mostrou estar envolvida em crescimento celular tumoral, maturação, diferenciação, invasividade, metástases, evasão imune e resistência a drogas [Rockenbach *et. al*, 2013]. Contudo, também tem sido descrita como marcador prognóstico favorável em alguns tumores, como câncer de ovário, mama, meduloblastoma e câncer de bexiga não-invasivo [Cappellari *et. al*, 2015; Dietrich *et. al*, 2017]. Porém, inibidores dessa enzima demonstraram efeitos antiproliferativos em linhagens celulares de câncer de bexiga e glioma, e diminuição da progressão do câncer de ovário [Rockenbach *et. al*, 2013, Jin *et. al*, 2010].

Uma forma truncada solúvel da CD73, que retêm sua capacidade de hidrólise, também foi descrita. Esta forma solúvel é gerada a partir do rompimento da âncora de GPI por uma fosfolipase específica de fosfatidilinositol ou através da clivagem proteolítica. A partir disso, a forma solúvel pode circular livremente na corrente sanguínea e outros fluidos biológicos. É sugerido que as nucleotidases solúveis podem representar um sistema efetor auxiliar importante para inativação local de nucleotídeos agudamente elevados, especialmente em sítios de injúria e inflamação [Antoniolli *et. al*, 2016].

No câncer de mama, a CD73 promove a ocorrência e desenvolvimento através de evasão imunológica, angiogênese e linfangiogênese [Barginear *et. al*, 2014; Antoniolli *et. al*, 2016].

Adicionalmente, dados publicados sugerem que esta proteína aumenta o crescimento e favorece o desenvolvimento de metástases através da adenosina [Yu *et. al*, 2017; Antonioli *et. al*, 2016]. Utilizando expressão gênica, foi possível determinar que uma alta expressão da CD73 pode estar relacionada com mau prognóstico, e com um aumento da resistência a doxorrubicina, uma antraciclina comumente utilizada na quimioterapia. Essa resistência se dá tanto pela supressão da produção do IFN- γ por células T CD8⁺ quanto pelo acúmulo de adenosina no meio extracelular [Loi *et. al*, 2013].

O acúmulo de células T com expressão de CD73 se mostrou um indicador de desfecho negativo e confere valor prognóstico negativo à infiltração de células T CD8⁺. Além disso, o acúmulo de adenosina gerada pela CD73 e subsequente inativação das células NK supressoras tumorais mediada pelos receptores A_{2A} mostrou-se um mecanismo fundamental para o desenvolvimento de metástases [Allard *et. al*, 2017]. Embora muitas questões relativas ao papel da CD73 na via purinérgica ainda não tenham sido resolvidas, as possibilidades de utilizá-la como alvo terapêutico para o tratamento de câncer de mama são muito promissoras [Loi *et. al*, 2013]. Existem estudos demonstrando a presença de exossomos isolados do plasma de pacientes com câncer, que carregavam CD39 e CD73 enzimaticamente competentes [Theodoraki *et. al*, 2018; Schuler *et. al*, 2014]. Além destes, nosso grupo de estudo já demonstrou expressão e atividade destas enzimas em linhagens celulares de tumores de próstata, bexiga, esôfago e meduloblastoma [Gardani *et. al*, 2018; Dietrich *et. al*, 2017; Santos *et. al*, 2017; Cappellari *et. al*, 2015].

Considerando os resultados de estudos com as enzimas CD39 e CD73 em diversos tipos de câncer, que demonstram o importante papel das mesmas no processo tumoral, são necessárias mais pesquisas a respeito destas proteínas para validá-las como possíveis marcadores prognósticos confiáveis, uma vez que a detecção destas no sangue periférico poderia ser uma alternativa menos invasiva para confirmação de características tumorais

obtidas a partir de biópsia, e/ou como possíveis alvos terapêuticos no câncer de mama, podendo ser utilizadas para desenvolvimento de agentes de tratamento específicos e com menor toxicidade sistêmica para os pacientes que possuem menor tolerabilidade ao tratamento, como é o caso dos idosos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em amostras de plasma sanguíneo de pacientes idosas com câncer de mama e correlacioná-los com dados clínico-patológicos na busca por possíveis biomarcadores e/ou alvos terapêuticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os perfis de hidrólise dos nucleotídeos no plasma sanguíneo, entre as pacientes antes do início do tratamento e no retorno após 6 meses, através da identificação do fosfato inorgânico liberado;
- Correlacionar os resultados da hidrólise dos nucleotídeos e da expressão das enzimas com os dados clínico-patológicos das pacientes.

CAPÍTULO II

3. ARTIGO ORIGINAL

Different treatments reduce AMP hydrolysis in blood plasma of breast cancer elderly patients

A ser submetido à revista *Journal of Translational Medicine*,

Fator de impacto 4.19

Different treatments reduce AMP hydrolysis in blood plasma of breast cancer elderly patients

Fernanda Valente Gheler¹, Angélica Regina Cappellari¹, Daiana Renck², Julia Brandt de Souza³, Renan Oliveira de Melo⁴, Carolina Aiko Moriguchi⁴, Paula Engroff⁵, Ana Paula Franco Lambert⁶, #Fernanda Bueno Morrone^{1,3,6}

¹*Escola de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil*

²*Escola de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;*

³*Escola de Ciências, Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;*

⁴*Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;*

⁵*Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil;*

⁶*Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS/Brasil.*

#Corresponding author

Dr. Fernanda Bueno Morrone,

Laboratório de Farmacologia Aplicada/Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,

Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone number: +55 51 3353 3512; Fax number: +55 51 3353 3612.

E-mail address: fernanda.morrone@pucrs.br; fbmorrone@gmail.com

Abstract

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer and the biggest mortality cause among women in the whole world, being strongly associated to ageing. This has a huge importance, once the rise of population's life expectancy is directly related to cancer (re) appearance risk. However, elderly population is frequently excluded from clinical trials and its treatments are based in data obtained from trials with younger population, not being ideal. This cancer's etiology is multifactorial, involving endocrine, reproductive and environmental factors and, less frequently, familiar predisposition. Tumor severity is defined by its size, node commitment, presence of metastasis, hormone receptors (estrogen and progesterone) and human epidermal growth factor receptor (HER2) expression, and the absence of all receptors, characterizing the most serious subtype. Adenine nucleotides are important signaling molecules that mediate biological functions in many conditions, including cancer. These molecules are hydrolyzed by several ectoenzymes named ectonucleotidases that are anchored in cell membrane surface and found circulating in the blood stream. In a coordinated manner, they produce adenosine in the extracellular milieu, which has a very important role in tumor development. This study aimed to analyze the tumor's molecular features on elderly patients, evaluating nucleotide hydrolysis (ATP to ADP and ADP to AMP made by CD39 and AMP to adenosine by CD73) in plasma blood as possible prognostic biomarkers and/or therapeutic targets, in order to improve these patients' disease outcomes. Peripheral blood samples were collected from BC patients with age above 60 years old at the moment of diagnosis and after 6 months of treatment. The nucleotide hydrolysis analysis was performed by malachite green method using ATP, ADP and AMP as substrates. The mean age of patients were 68 years old and about 66,6% with tumors stage I and II, and 33,3% staging III and IV, representing worse prognosis. Results showed BC patients had lower ADP and higher AMP hydrolysis when compared to control. When analyzing differences between the diagnose samples and the ones collected after 6 months, we were able to show a significant reduction on AMPase activity, making the profile of treated individuals look like the healthy individuals', independently of which treatment was used. This way, we can conclude that understanding the ectonucleotidases activity role in cancer progression can help this disease complexity understanding, looking forward to improve early detection and therapeutic approach on elderly patients.

Keywords: Breast cancer; elderly patients; plasma blood; hydrolysis; ectonucleotidases; CD39; CD73.

INTRODUCTION

According to the International Agency for Cancer Research (IARC), breast cancer is the most common type of cancer among women. In Brazil, breast cancer is the most prevalent, mainly on the southern and southeast regions, concentrating about 70% of the occurrence of new cases [1]. Besides that, low and middle-income countries have diagnosis in later stages of the disease, increasing treatment related morbidity, quality of life impairment and reducing overall survival [1,2,5].

The etiology for breast cancer is multifactorial, involving endocrine and reproductive factors, besides environmental such as factors like lifestyle (alcohol consuming, overweight), use of oral contraceptives and hormone replacement and radiation exposure [1,2]. Approximately 5% of the cases have familiar predisposition, related to BRCA 1 and 2 gene mutation [2,6]. The disease has three different predominant pathological status: hormonal receptors expression (estrogen and progesterone), responsible for 70% of the total cases, overexpression of HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), which represents about 20%, and the remaining are triple negative type (TNBC – triple negative breast cancer) that does not present expression of neither HR or HER2 [7,8,9].

Comparing to younger women, older patients are more likely to present high ER and PR expression breast cancer, with or without HER2 expression [8]. The tumor size and nodal involvement increase with age and can be explained by the late diagnosis in this population. However, the increase of nodal involvement is related to smaller tumors, suggesting small but aggressive tumors in older women [8,10,11]. Furthermore, the 5 to 10 years relative survival of older than 70 years patients is shorter than patients between 40 and 70 years. This may be due to insufficient treatment, socioeconomic differences and unequal access to health care contribute to worse prognosis in poorer countries [2,10]. The underestimation of life expectation and therapy adjusts can result in insufficient treatments, being considered a major

risk factor to cancer recurrence and death [4,13,14]. Elderly patients represent about 60% of all cancer patients, but they are initially excluded from clinical trials because of the age restrictions, although disease-specific mortality and recurrence chance increase are significant [2,13].

Purine nucleotides (ATP, ADP, UTP and UDP) and nucleosides (adenosine) are characterized as extracellular messengers [15,16,17]. Besides their presence in normal conditions, the exacerbated release, not only of ATP, but UTP and UDP is caused by different stressor agents, such as plasmatic membrane damages, platelet aggregation, viral or bacterial infections and mechanical stress. ATP works as an alert sign, activating the immune cells nearby to fight microorganisms, start tissue repair responses and find and engulf apoptotic cells [16,18]. Once on the extracellular milieu, ATP and ADP are quickly hydrolyzed to AMP by NPTDase1/CD39, and subsequently to adenosine (ADO) by ecto-5'-nucleotidase/CD73 or alkaline phosphatase (ALP) [15,16,18,19]. The CD39 is found anchored to plasmatic membrane by two transmembrane domains essential to its catalytic activity and substrate specificity [20]. It is a lymphocytic activity marker and has fundamental role on immune system control by purinergic signalling modulation [18,21]. There are evidences that NTPDase1 catalytically active can be released as plasma membrane fragments from expressing cells. In addition, it can be found incorporated into exosomes released by various tumor types [21].

Ecto-5'-nucleotidase is a glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored enzyme expressed on the surface of subsets of human lymphocytes that hydrolyze the extracellular AMP into ADO, regulating extra and intracellular environment [3]. Its expression is related to cellular adhesion and proliferation. Besides, it also works in cellular migration and invasion events, due to its role as adhesion molecule [22]. The soluble form can be disconnected from the membrane and can circulate freely in the bloodstream and other biologic fluids. It is suggested that soluble nucleotidases may represent an important auxiliary effector system to local nucleotide inactivation that are acutely elevated, especially on injury and inflammation sites [23].

Cancer has the ability of growing subverting the immune suppression routes, avoiding recognition of malignant cells as dangerous or strange. This mechanism makes cancer escape from immune elimination and allows disease's progression from an initial to a lethal stage [18].

One of the critical points to understand the tumor-host interaction is tumor microenvironment's biochemical composition. It was recently shown that ATP concentration on extracellular tumor milieu reaches hundreds of micromolar, which is different from normal tissues [24]. Thus, tumor microenvironment becomes an active ATP release/generation site and its conversion to adenosine, producing growth factors and immunomodulators. In vivo studies shown that solid tumor extracellular milieu have high concentration of adenosine, generated by conjunct action of CD39 and CD73 ectonucleotidases [24,25]. Due to adenosine's well-known immune suppressor action, these findings give a crucial clue to understand the immune system evasion strategies by cancer and its participation in this process [24].

CD73 has been reported to promote breast cancer occurrence and development through immune evasion, angiogenesis and lymphangiogenesis [3,23]. Additionally, published data suggest that this protein improves growth and favors metastasis by ADO [4,23]. High CD73 expression may be related to bad prognosis and high doxorubicin resistance, a commonly used anthracycline used on its treatment [22]. Also, CD39 expression, with consequent ATP hydrolysis and adenosine generation, may compromise antitumor immune responses, including the ones mediated by natural killer cells [20]. Considering that previous studies have described CD39 and CD73 expression and activity on different kinds of tumor cell lines, prostate, bladder, esophagus and medulloblastoma [26,27,28,29], it seems necessary to validate the hydrolysis of these enzymes in the blood plasma as reliable prognostic markers and therapeutic targets in breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Adenosine-5'triphosphate (ATP), Adenosine-5'diphosphate (ADP), Adenosine-5' monophosphate (AMP), α - β -methylene-ADP (APCP), Malaquite Green, Coomassie Blue and Tris-HCl were purchased by Sigma Aldrich. Levamisole was purchase by Santa Cruz Biothecnology.

Subjects

Twenty-four women above sixty (60) years old with breast cancer diagnosis participated of this study. These patients were diagnosed and started their treatment at São Lucas da PUCRS Hospital's Oncology Center, after formalized the participation in the study through Adherence to Informed Consent Standards (AICS) before blood collection. Previous chemotherapy treatment on the past ten years was used as exclusion criteria. The control group consisted in fifteen elderly women with no cancer diagnostic, but with chronic diseases (hypertension, diabetes, etc.) under treatment. The study was approved by the Ethical Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (CAAE: 65653717.0.0000.5336).

Blood collection

Blood samples (4mL) were collected before initiating cancer treatment and after six months of treatment. The blood was collected in plastic tubes with heparin. For plasma isolation, samples were centrifuged at 4000 rpm for 12 minutes. After centrifugation, the supernatant was stored at -80°C until posterior biochemistry analysis.

Protein Analysis

The quantification of protein levels in all plasma samples was performed by Coomassie Blue method, as described by Bradford *et al.*, 1976, using bovine serum albumin as standard.

Nucleotide Hydrolysis Assay

The incubation protocol was performed as described by Moritz *et al.* 2017. For “ATP, ADP and AMP hydrolysis determinations in blood plasma, samples were pre-incubated with Tris-HCl buffer 112.75 mM (final concentration) pH 8.0 for 10 minutes at 37°C and, to start reactions, substrates (ATP, ADP and AMP) were added to samples in a final concentration of 3 mM. At 50 min after incubation, 5% (final concentration) trichloroacetic acid (TCA) was added to stop reaction, and samples were subsequently chilled on ice. The samples were centrifuged at 14000 rpm for 12 minutes and, according to Chan *et al.*, 1986, the amount of inorganic phosphate (Pi) released was analyzed by the Malachite Green colorimetric method with minor modifications. Controls were performed to correct the nonenzymatic substrate hydrolysis. All samples were processed in triplicate. Enzyme activities were expressed as pmol of Pi released per minute per milligram of protein (pmol/min/mg).

Complementary Data

The information regarding Ki67 status and tumor degree were collected from patients' medical chart, which contained results of biopsy immunohistochemical assays ordered by the oncologist to detail the diagnosis.

Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm standard error mean (SEM). Statistical analyzes were performed using the program SPSS. The graphics were produced using Graphpad Prism 5.01, San Diego, CA, USA. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

In this study, we analyzed 24 elderly patients with breast cancer diagnosis. The median age of these patients was 68 years, and the subtypes of breast cancer identified were: 6 with Luminal A (25.0%), 6 with Luminal B (25.0%), 7 with HER2 positive (29.2%) and 4 TNBC (16.7%). According to TNM Staging System, 16 patients (66.6%) presented stages I to II, and 8 patients (33.3%) had stages III and IV, which represent worse prognosis. The comorbidities presented by breast cancer patients were cardiovascular disease (54.2%), endocrine disease (37.4%), psychiatric conditions (45.8%), gastrointestinal disease (12.5%) bone and joint disease (29.2%) and respiratory tract disease (20.8%). Fifteen patients were conducted to surgery (62.5%), while 18 received chemotherapy (75%), 14 received hormone therapy (58.6%) and 16 received radiotherapy (66.6%) after diagnosis (Table 1).

Firstly, we evaluated the nucleotide hydrolysis in blood plasma of breast cancer patients and healthy women (Figure 1). The results demonstrated that, at the moment of diagnosis, breast cancer patients did not present significant difference in hydrolyze ATP (58.17 ± 66.60 pmol/min/mg of protein - PTN) and ADP (76.67 ± 73.95 pmol/min/mg PTN) in comparison to healthy woman (37.71 ± 73.70 and 108.50 ± 125.28 pmol/min/mg PTN, respectively). In addition, breast cancer patients presented a tendency to hydrolyze more AMP (124.21 ± 82.18 pmol/min/mg PTN) than healthy women evaluated (80.43 ± 69.52 pmol/min/mg PTN), respectively.

When we compared the nucleotide hydrolysis in patients' blood plasma before starting the treatment (at the moment of diagnosis) (157.15 ± 72.67 pmol/min/mg PTN) with the samples collected after 6 months (76.23 ± 81.85 pmol/min/mg PTN), we could observe a significant reduction of AMPase activity. The ATP and ADP hydrolysis profile did not present any significant difference (48.31 ± 56.65 to 65.92 ± 104.32 and 91.23 ± 82.69 to 120.85 ± 122.48 pmol/min/mg PTN, respectively) (Figure 2). The comparison of each nucleotide

hydrolysis profile among the different groups of women analyzed, showed that there wasn't any significant difference, although there was a tendency of patients after 6 months of treatment to hydrolyze the nucleotides in the same levels of healthy women (Figure 3).

In sequence, we analyzed the profile of breast cancer patients' hydrolysis performing the correlation between diagnosis and after 6 months groups, considering each treatment. The analysis showed a significant reduction of AMPase activity in all treatments studied (surgery, chemotherapy, radiotherapy and hormone therapy), including the patients that did not receive hormone therapy, explained by the fact that these patients had a non-hormonal cancer profile and received other kinds of treatments (Table 2).

We also evaluated the nucleotide hydrolysis in relation to Ki67 status, which measures the proliferation rates (Table 3). In accordance to Rossi *et. al* (2015), high Ki67 (>20%) correspond to high proliferation rates, and low Ki67 levels ($\leq 20\%$) correspond to low proliferation. Forty seven percent of the patients studied here, presented low Ki67 score and 52.2% had a high proliferation rate. When comparing the hydrolysis of ATP, ADP and AMP between these groups, we found no significant difference. Besides that, we divided the patients in two groups based on Clinical Stage defined by TNM classification, which defines tumor size, lymph nodes affected and presence of metastasis. The first group consisted of patients arranged in I and II stages (66.7%), and the second of patients in III and IV stages (33.3%) and both did not presented any difference in the nucleotide hydrolysis (Table 3).

Discussion

Breast cancer is the most common and the highest mortality cause of women in whole world, and it is estimated 60 thousand new cases to 2018 and 2019 in Brazil [1,9]. Looking closely to the tumoral scenario, purinergic system has a crucial role to its development and

avoid organism attempts to beat it. It is well known that ATP and ADP working in a synchronized manner to favoring the tumor growth [24]. In this study, we compared the nucleotide (ATP, ADP and AMP) hydrolysis in blood plasma of breast cancer patients and healthy women. The data showed that breast cancer patients have a tendency to hydrolyze more AMP (Figure 1), showing that this malignancy may cause alterations on nucleotide metabolism and generate an increased amount of circulating adenosine that has anti-inflammatory activity, helping the tumor to evade the immune system [24]. These results are in accordance to those demonstrated by Morello *et. al* (2017) and Gardani *et. al* (2019), that showed high AMPase activity in blood samples of stage IV melanoma and prostate cancer patients, respectively. Both authors related this activity to CD73 through tests with inhibitors, proposing this enzyme activity as a possible plasma biomarker to kinds of cancer [26,34]. Besides, other studies demonstrate the expression of CD73 on breast cancer cells and tumor-infiltrating leukocytes [35] reinforcing the idea that this enzyme is responsible for the increased adenosine concentration in cancer patients.

When we compared the AMP hydrolysis at the diagnosis with samples collected after 6 months of treatment, we could observe a significant reduction in all groups: surgery, chemotherapy, radiotherapy and hormone therapy, were the last one showed significance also on not treated group, explained by the fact that these patients had a non-hormonal cancer profile and received other kinds of treatments. The important reduction of AMPase activity in patients after the treatment could constitute a marker to treatment effectiveness. Despite the fact that CD39 is related to tumor progression, our study did not evidence significant activity that could be related to this enzyme, once the ATP and ADP hydrolysis were similar between the BC patients and healthy group. Corroborating to our data, Bastid *et. al* (2015) did not find significant CD39 activity on breast cancer cell lines [36]. Interestingly, the results of the nucleotide hydrolysis before and after treatment showed that breast cancer patients profile differs from healthy women at the moment of diagnosis, but when we look after 6 months, this

group showed a tendency to diminish AMP and to increase ATP hydrolysis, becoming close to healthy individuals profile. Araujo *et. al* (2005) analyzed CD39 and CD73 activity on breast cancer patients' platelets with and without treatment intervention, between 20 and 85 years old. Results showed nucleotide hydrolysis alteration on these patients' samples, indicating that these molecules metabolism changes may interfere, also, on platelet activation. Besides that, studies including elderly patients are important, once these patients are often excluded from clinical trials [8,10].

Regarding the Ki67 immunohistochemistry, which is related to tumor proliferation rates, we observed that the group presenting low Ki67 status had less AMPase activity when compared to high Ki67. This could be related to CD73 expression and activity and worse prognosis, once higher activity is present on plasma patients with tumors that proliferate more, being more aggressive. These results are in accordance to Morello *et. al* (2017), who demonstrated worse prognosis in blood samples of stage IV melanoma patients that had higher CD73 activity [33]. Loi *et. al* (2013) also showed high levels of CD73 expression on TNBC patients' lymphocytes with bad prognosis and anthracyclines resistance [22]. But the association of CD73 with long-term survival is still a matter of debate, maybe due to the strong heterogeneity of breast cancers [39], and a study by Supernat *et. al* (2012) relates high levels of CD73 to better overall survival in breast cancer stages I to III [40]. Besides that, when we divide the breast cancer patients according to de Clinical Stage, considering stages I and II the ones with lighter tumors and stages III and IV with worst diseases, we can see a tendency to higher ATP and lower ADP hydrolysis on the first group. These results suggest that high ATPase activity observed in the initial stages was involved in the early tumor development, when there is hypoxia, and elevated ATP secretion, what could promote the recruitment of immune system to tumor site [19]. The AMPase activity seems to be similar in both groups.

Although breast cancer in elderly patients have more favorable features than younger patients, regarding hormone receptor expression profile, tumor grade and proliferation rate, these patients are often diagnosed in later stages and undertreated due to physicians concerns about appropriate therapy and surgical choose [8,36]. In fact, Gal *et. al* (2017) demonstrated that biologic features between 65-75 years and above 75 years old do not differ, but the second group receive less treatment [36]. Also, there are few evidences regarding treatment on this population because the clinical trials, usually, do not include them, making the treatment decisions be based on extrapolation of studies with younger groups. Tumor biological features and treatment tolerance of elderly breast cancer patients vary, besides other mortality risks [8,10,38]. Here, we analyzed breast cancer patients regarding comorbidities and medications used and found no difference affecting the enzymatic activity. This may be considered a good prognostic, because alterations on these enzymes activity could interfere on cancer treatment.

In conclusion, AMPase activity, which was reduced after six months of the patients treatment, could constitute an important plasma biomarker and thus allow less invasive procedures on elderly patients follow-up, who suffer from side effects of treatment against breast cancer. This study reinforces the need to include elderly patients in clinical trials, and the importance to study their characteristics and profiles to a better understanding of their needs regarding to the treatment and quality of life.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Finance Code 001, FAPERGS (PPSUS-17/2551-0001455-3) and FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) research grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) # 01.11.0014-00.

Conflicts of Interest Notification

Authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Ethical Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (CAAE: 65653717.0.0000.5336).

Informed Consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.
2. Stewart, B. W.; Wild, C. P. (Ed.). World Cancer Report: 2014. Lyon: IARC, 2014.
3. Barginear MF, Muss H, Kimmick G, Owusu C, Mrozek E, Shahrokni A, Ballman K, Hurria A. Breast cancer and aging: results of the U13 conference breast cancer panel. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jul;146(1):1-6. doi: 10.1007/s10549-014-2994-7. Epub 2014 May 22.
4. Yu, J., Liao, X., Li, L. et al. A preliminary study of the role of extracellular -5'-nucleotidase in breast cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* (2017) 53: 132. doi:10.1007/s11626-016-0089-y.

5. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
6. De Souza Timoteo AR, Gonçalves AÉMM, Sales LAP, Albuquerque BM, Souza JES, Moura PCP, Aquino MAA, Agnez-Lima LF, Lajus TBP (2018). A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. doi:10.1007/s10549-018-4938-0
7. Saraiva DP, Cabral MG, Jacinto A, Braga S. How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment. *ESMO Open*. 2017; 2(4): e000208.
8. Tesarova, P. Specific Aspects of Breast Cancer Therapy of Elderly Women. *BioMed Research International*, 2016:1381695. doi: 10.1155/2016/1381695
9. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. (2017) 50:33. 10.1186/s40659-017-0140-9
10. Biganzoli L, Wildiers H, Oakman C, Marotti L, Loibl S, Kunkler I, Reed M, Ciatto S, Voogd AC, Brain E, Cutuli B, Terret C, Gosney M, Aapro M, Audisio R. Management of elderly patients with breast cancer: updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG) and European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA). *Lancet Oncol* 2012; 13: e148–60.
11. International Breast Cancer Study Group, Rudenstam CM, Zahrieh D, Forbes JF, Crivellari D, Holmberg SB, Rey P, Dent D, Campbell I, Bernhard J, Price KN, Castiglione-Gertsch M, Goldhirsch A, Gelber RD, Coates AS. Randomized trial comparing axillary clearance versus no axillary clearance in older patients with breast cancer: first results of International Breast Cancer Study Group Trial 10-93. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 20;24(3):337-44.

12. Roder D, Farshid G, Kollias J, et al. Female breast cancer management and survival: The experience of major public hospitals in South Australia over 3 decades—trends by age and in the elderly. *J Eval Clin Pract.* 2017;1–11. <https://doi.org/10.1111/jep.12819>
13. Bouchardy C, Rapiti E, Blagojevic S, Vlastos AT, Vlastos G. Older Female Cancer Patients: Importance, Causes, and Consequences of Undertreatment. *J Clin Oncol* 2007 25:1858-1869.
14. Van de Water W, Markopoulos C, van de Velde CJ, et al. Association between age at diagnosis and disease-specific mortality among postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer. *JAMA.* 2012; 307:590–597.
15. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 661.
16. Ferrari D, Malavasi F, Antonioli L. A Purinergic Trail for Metastases. *Trends in Pharmacological Sciences*, March 2017, Vol. 38, No. 3.
17. Santos KF, Gutierrez JM, Pillat MM, Rissi VB, Santos Araújo MD, Bertol G, Gonçalves PB, Schetinger MR, Morsch VM. Uncaria tomentosa extract alters the catabolism of adenine nucleotides and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and P2X7 and A1 receptors in the MDA-MB-231 cell line. *J Ethnopharmacol.* 2016 Dec 24;194:108-116. doi: 10.1016/j.jep.2016.08.051.
18. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews* 2017; 276: 121-144.
19. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumor microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2018. Doi:10.1038/s41568-018-0037-0.

20. Cai XY, Ni XC, Yi Y, et al. Overexpression of CD39 in hepatocellular carcinoma is an independent indicator of poor outcome after radical resection. Kapritsou. M, ed. *Medicine*. 2016;95(40):e4989.
21. Herbert Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*. 2012 Sep;8(3):437-502.
22. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, Stagg J. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):11091-6. doi: 10.1073/pnas.1222251110.
23. Antonioli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, Haskó G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer*. 2016 February 1; 2(2): 95–109. doi:10.1016/j.trecan.2016.01.003.
24. Burnstock, G, Di Virgilio, F. Purinergic signalling in cancer. *Purinergic Signal* 2013. 9, 491–540. doi: 10.1007/s11302-013-9372-5
25. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103:13132–13137.
26. Gardani CFF, Cappellari AR, Souza JB, Silva BT, Engroff P, Moritz CEJ, Scholl JN, Battastini AMO, Figueiró F, Morrone FB. Hydrolysis of ATP, ADP and AMP are increased in blood plasma of prostate cancer patients. *Purinergic Signal* 2019. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9642-3>.
27. Dietrich F, Figueiró F, Filippi-Chiela EC, Cappellari AR, Rockenbach L, Tremblay A, Paula PB, Roesler R, Braga Filho A, Sévigny J, Morrone FB, Battastini AMO. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 contributes to the radiosensitivity of T24 human bladder cancer cell

- line. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Mar;144(3):469-482. doi: 10.1007/s00432-017-2567-3
28. Santos AA Jr, Cappellari AR, de Marchi FO, Gehring MP, Zaparte A, Brandão CA, Lopes TG, da Silva VD, Pinto LFR, Savio LEB, Moreira-Souza ACA, Coutinho-Silva R, Pაცეც JD, Zerbini LF, Morrone FB. Potential role of P2X7R in esophageal squamous cell carcinoma proliferation. *Purinergic Signal*. 2017 Sep;13(3):279-292. doi: 10.1007/s11302-017-9559-2.
29. Cappellari AR, Pillat MM, Souza HD, Dietrich F, Oliveira FH, Figueiró F, Abujamra AL, Roesler R, Lecka J, Sévigny J, Battastini AM, Ulrich H. Ecto-5'-Nucleotidase Overexpression Reduces Tumor Growth in a Xenograph Medulloblastoma Model. *PLoS One*. 2015 Oct 22;10(10):e0140996. doi: 10.1371/journal.pone.0140996. eCollection 2015.
30. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
31. Moritz CEJ, Teixeira BC, Rockenbach L, Reischak-Oliveira A, Casali A, Battastini AMO. Altered extracellular ATP, ADP, and AMP hydrolysis in blood serum of sedentary individuals after an acute, aerobic, moderate exercise session. *Mol Cell Biochem* (2017) 426:55–63. DOI 10.1007/s11010-016-2880-1
32. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380. doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8.
33. Morello S, Capone M, Sorrentino C, Giannarelli D, Madonna G, Mallardo D, Grimaldi AM, Pinto A, Ascierto PE (2017) Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. *Journal of translational Medicine*, 15:244. doi: /10.1186/s12967-017-1348-8.

34. Buisseret L, Pommey S, Allard B, Garaud S, Bergeron M, Cousineau I, Ameye L, Bareche Y, Paesmans M, Crown JPA, Di Leo A, Loi S, Piccart-Gebhart M, Willard-Gallo K, Sotiriou C, Stagg J. Clinical significance of CD73 in triple-negative breast cancer: multiplex analysis of a phase III clinical trial. *Ann Oncol*. 2018 Apr 1;29(4):1056-1062. doi: 10.1093/annonc/mdx730.
35. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Déjou C, Giustiniani J, Laheurte C, Cochaud S, Laprevotte E, Funck-Brentano E, Hemon P, Gros L, Bec N, Larroque C, Alberici G, Bensussan A, Eliaou JF. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res*. 2015 Mar;3(3):254-65. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0018.
36. Gal O, Ishai Y, Sulkes A, Shochat T, Yerushalmi R. Early Breast Cancer in the Elderly: Characteristics, Therapy, and Long-Term Outcome. *Oncology*. 2018;94(1):31-38. doi: 10.1159/000480087.
37. Araújo MC, Rocha JB, Morsch A, Zanin R, Bauchspiess R, Morsch VM, Schetinger MR. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun 10;1740(3):421-6.
38. Turner, N; Zafarana E; Becheri, D; Mottino, G; Biganzoli, L. Breast Cancer in the Elderly: Which Lessons Have We Learned? *Future Oncol*. 2013; 9(12):1871-1881.
39. Lafont V, Michaud HA, Bonnefoy N. CD73: a new biomarker in triple-negative breast cancer. *Transl Cancer Res* 2018;7(Suppl 5):S594-S596. doi: 10.21037/tcr.2018.05.22
40. Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J, Czapiewski P, Biernat W, Zaczek A. CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012 Mar;20(2):103-7

Figure Legends

Figure 1. *Nucleotide hydrolysis – Comparison between BC and Healthy patients.* ATP, ADP and AMP hydrolysis was evaluated in blood plasma as described in Materials and Methods section, and final values were described as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. The experiments were performed in triplicates. Data were expressed as mean \pm SEM and analyzed by t test with independent samples on SPSS statistical program, and the results were considered significant when p value $< 0,05$.

Figure 2. *Comparison between diagnosis and after 6 months of treatment BC patients.* The ATP hydrolysis did not show much difference before and after 6 months of treatment, and ADP hydrolysis presented a tendency to increase. AMPase activity had a significant decrease on the second sample, showing possible treatment effectiveness. The analysis was performed as described in Materials and Methods section, and final values were described as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. The experiments were performed in triplicates. Data were expressed as mean \pm SEM and analyzed by paired t test on SPSS program, and the results were considered significant when p value < 0.05 . ** Identifies the significant reduction on AMPase activity.

Figure 3. *Nucleotide hydrolysis profile – comparison between healthy patients, BC patients at diagnosis and BC patients after 6 months.* This graph displays the nucleotides hydrolysis in the three analyzed groups. Comparing the three profiles in parallel, we are able to see how patients' profile after treatment approached to the healthy individual's profile, different from the same patients at the moment of diagnosis – once again, the possibility of treatment effectiveness is shown. The analysis was performed by One Way ANOVA test on GraphPad Prism5 program, and the results were considered significant when p value < 0.05 .

Figures

Figure 1.

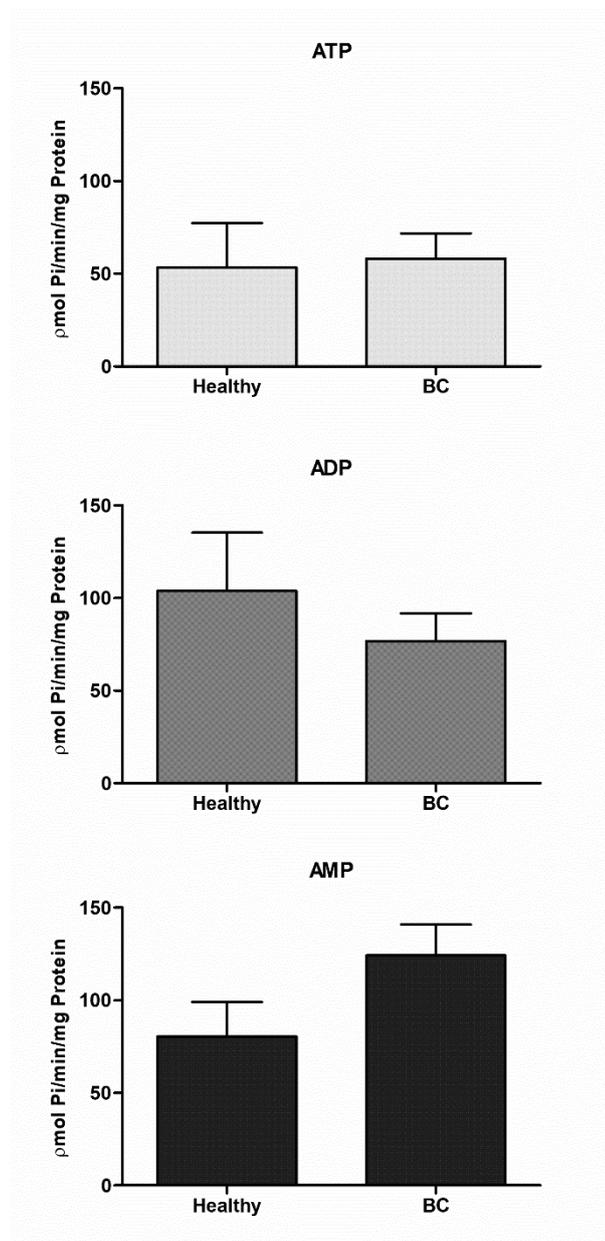


Figure 2.

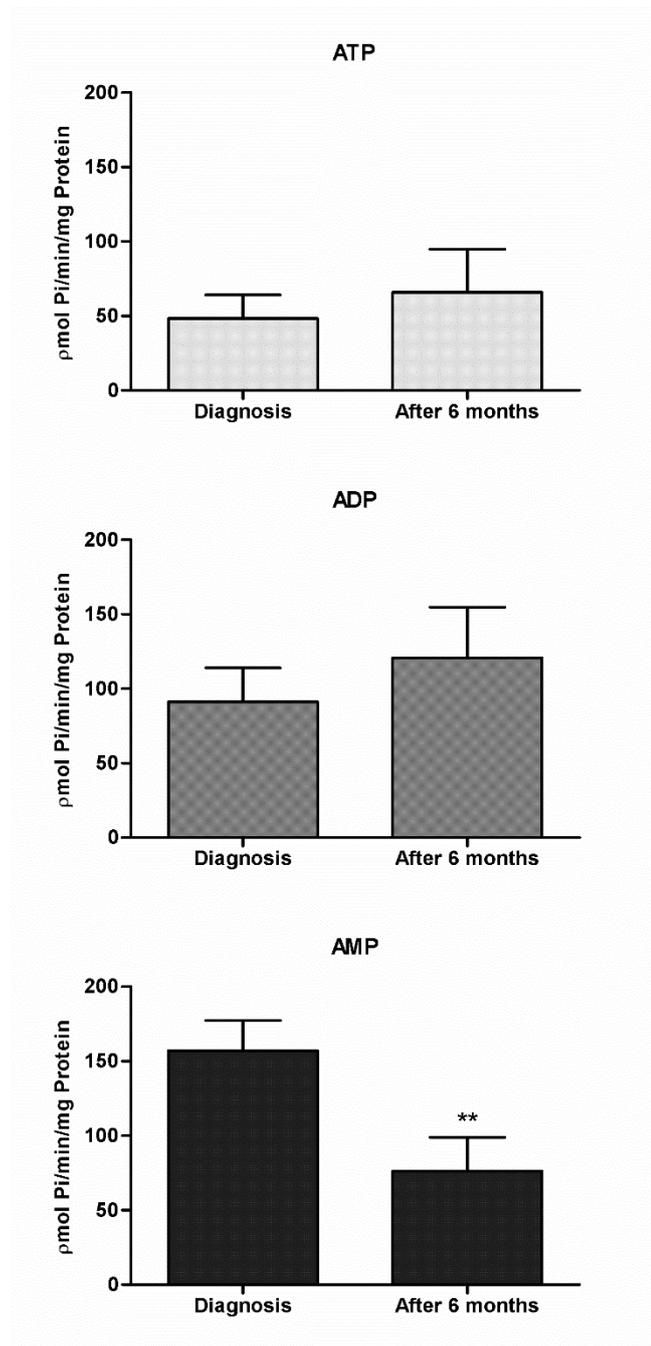


Figure 3.

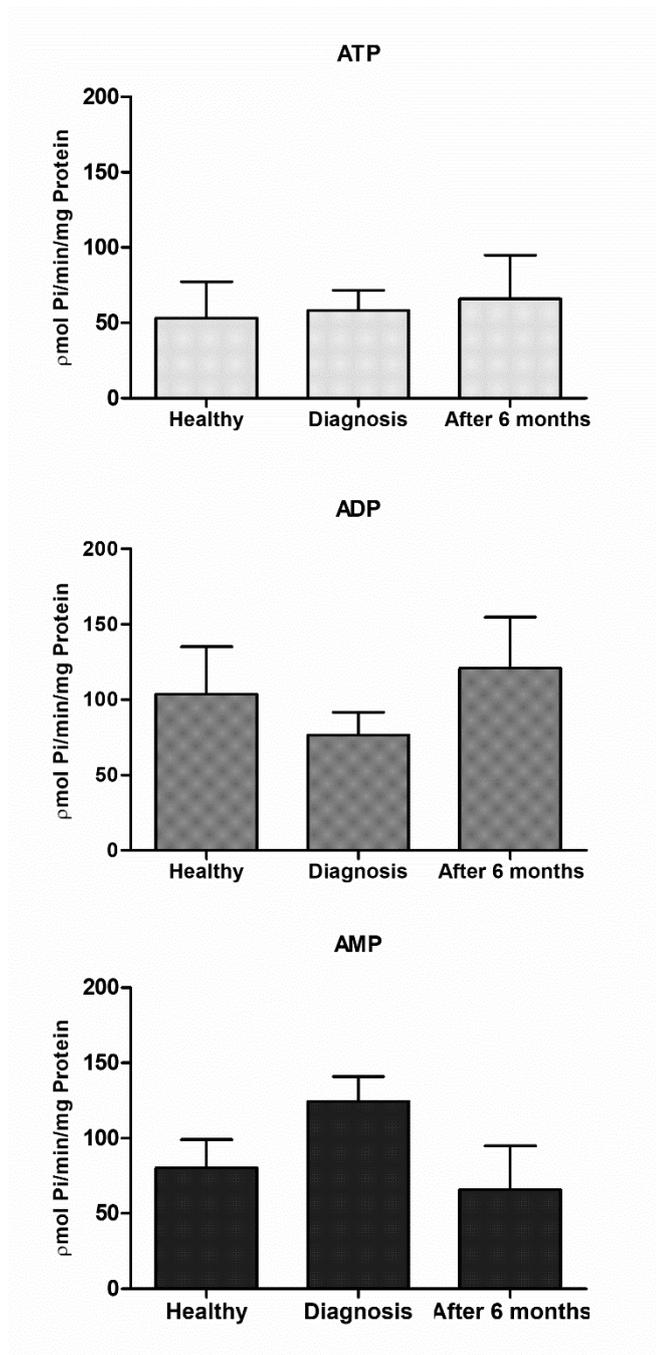


Table 1. Clinical and pathological data of breast cancer patients.

Characteristics	N	%
<i>Age (years)</i>		
Mean	68	
Range	61-76	
<i>Tumor type</i>		
Luminal A	6	25
Luminal B	6	25
HER2	7	29.2
Triple Negative	4	16.7
<i>Grade</i>		
1 (well differentiated)	3	12.5
2 (moderately differentiated)	12	50
3 (poorly differentiated)	6	25
<i>Clinical Stage</i>		
I and II	16	66.6
III and IV	8	33.3
<i>Associated Comorbidities</i>		
Cardiovascular disease	13	54.2
Endocrine disease	9	37.5
Psychiatric disease	11	45.8
Gastrointestinal disease	3	12.5
Bone and articular disease	7	29.2
Respiratory tract disease	5	20.8
<i>Breast Cancer Treatment</i>		
<i>Surgery</i>		
Yes	15	62.5
No	9	37.5
<i>Chemotherapy</i>		
Yes	18	75
No	6	25
<i>Radiotherapy</i>		
Yes	16	66.6
No	8	33.3
<i>Hormone therapy</i>		
Yes	14	58.3
No	10	41.6

Table 2. Evaluation of nucleotide hydrolysis according to different kinds of treatment.

<i>Treatment</i>	<i>Nucleotide Hydrolysis</i> ($\mu\text{mol Pi/min/mg PTN}$)		
	<i>ATP</i>	<i>ADP</i>	<i>AMP</i>
<i>Chemotherapy</i>			
<i>Diagnosis (n=12)</i>	48.00±59.16	93.75±85.84	153.00±74.26
<i>After treatment (n=12)</i>	68.83±108.40	129.42±123.79	80.75±83.78*
<i>Surgery</i>			
<i>Diagnosis (n=9)</i>	63.11±61.48	80.00±76.05	176.22±56.16
<i>After treatment (n=9)</i>	76.33±119.56	122.56±124.29	80.11±79.07*
<i>Radiotherapy</i>			
<i>Diagnosis (n=10)</i>	62.00±58.07	78.10±71.95	179.30±53.83
<i>After treatment (n=10)</i>	71.80±113.63	112.40±121.76	74.30±76.78*
<i>Hormonotherapy</i>			
<i>Diagnosis (n=6)</i>	47.67±37.05	94.83±82.07	139.50±86.03
<i>After treatment (n=6)</i>	109.00±136.36	151.00±116.313	41.17±62.10*

*Demonstrate statistical difference in relation to nucleotide hydrolysis at diagnosis and after 6 months. All treatments showed significance on AMP hydrolysis, and the group of patients who did not receive hormone therapy also had significant results. The values represent mean ± SD. Only the patients who had the 6 months return were analyzed. The analysis were performed by SPSS and Graphpad Prism statistical programs, using paired t test.

Table 3. Relation between Ki67 score and Clinical Stage with Nucleotide Hydrolysis

<i>Nucleotide</i>	<i>Ki67*</i>		<i>Clinical Stage</i>	
	High (>20%)	Low (\leq 20%)	I and II	III and IV
<i>Hydrolysis (ρmol Pi/min/mg PTN)</i>	n = 12	n = 11	(n = 16)	(n = 8)
ATP	50.08 \pm 41.49	72.27 \pm 87.58	70.69 \pm 75.06	33.13 \pm 37.75
ADP	83.41 \pm 63.18	66.91 \pm 89.20	58.88 \pm 57.16	112.25 \pm 93.78
AMP	149.08 \pm 89.36	101.82 \pm 72.00	120.56 \pm 89.64	131.50 \pm 69.86

*The Ki67 score were collected from patients' medical chart. One of the patients did not have Ki67 information related, and, to this analysis, her data were not considered. The statistical analysis was performed by GraphPad 5 program, using unpaired t test. Significance was considered when p value < 0.05.

CAPÍTULO III

4. Discussão

O câncer de mama é o mais comum e a maior causa de mortalidade de mulheres em todo o mundo, e são estimados 60 mil novos casos em 2018 e 2019 no Brasil [INCA, 2017; Akramet. *al*, 2017]. Olhando atentamente ao cenário tumoral, o sistema purinérgico tem papel fundamental ao seu desenvolvimento e tentativas do organismo de combatê-lo. É bem descrito que ATP e ADO trabalham de maneira sincronizada para favorecer o crescimento tumoral [Burnstocket. *al*, 2013]. Nesse estudo, comparamos a hidrólise de nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) no plasma sanguíneo de pacientes com câncer de mama e de indivíduos sem o diagnóstico da doença. Os dados demonstraram que os pacientes com câncer têm uma tendência a hidrolisar mais AMP (Figura 1), mostrando que esta malignidade pode causar alterações no metabolismo dos nucleotídeos e gerar um aumento na concentração da adenosina circulante, que tem atividade antiinflamatória, auxiliando o tumor a evadir o sistema imune [Burnstocket. *al*, 2013]. Esses resultados estão de acordo com os demonstrados por Morello *et. al* (2017) e Gardani *et. al* (2019), que mostraram, alta atividade AMPásica em amostras sanguíneas de pacientes com melanoma estágio IV e câncer de próstata, respectivamente. Ambos os autores relacionaram esses resultados à atividade da CD73 através de testes com inibidores, propondo esta enzima como possível biomarcador plasmático aos tipos tumorais avaliados [Gardani *et. al*, 2019; Morello *et. al*, 2017]. Além disso, outros estudos demonstraram a expressão da CD73 em células tumorais de mama e leucócitos infiltrantes tumorais [Buisseret *et. al*, 2018], reforçando a ideia de que esta enzima é responsável pela alta concentração de adenosina nos pacientes oncológicos.

Quando comparada a hidrólise de AMP no momento do diagnóstico com amostras coletadas das mesmas pacientes após 6 meses de tratamento, pudemos observar uma redução significativa em todos os grupos de tratamento (cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia endócrina). No caso da terapia endócrina, o grupo dos pacientes não tratados também teve

redução significativa, podendo ser explicado pelo fato de esses pacientes não apresentarem tumores com expressão de receptores hormonais e receberam outros tratamentos. A redução importante na atividade AMPásica nos pacientes após o tratamento pode significar uma prova de efetividade do tratamento. Apesar do fato de a CD39 estar relacionada à progressão tumoral, nosso estudo não evidenciou atividade significativa que pudesse ser realizada por ela, uma vez que a hidrólise de ATP e ADP foi similar entre as pacientes e o grupo controle. Para reforçar nossos dados, Bastid *et. al* (2015) não encontraram atividade significativa da CD39 em linhagens celulares de câncer de mama [Bastid *et. al*, 2015].

O resultado mais interessante apresentado aqui foi a comparação do perfil da hidrólise de nucleotídeos antes e depois dos tratamentos, na qual a primeira amostra diferiu do perfil dos indivíduos saudáveis, mas quando olhamos o perfil da segunda amostra, pudemos observar uma tendência a diminuir a hidrólise de AMP e aumentar a de ATP, ficando muito similar ao das pacientes sem câncer. Araujo *et. al* (2005) analisaram a atividade da CD39 e CD73 em plaquetas de pacientes com câncer de mama com e sem intervenção terapêutica, entre 20 e 85 anos. Os resultados demonstraram alteração na hidrólise de nucleotídeos dos pacientes oncológicos, indicando que o metabolismo dessas moléculas pode interferir, também, na ativação plaquetária [Araujo *et. al*, 2005].

Com relação ao Ki67, índice que indica a taxa de proliferação tumoral, foi possível observar que o grupo que apresentou Ki67 abaixo de 20%, considerado baixo, tendeu a um perfil de atividade AMPásica menor que o grupo com taxa superior a 20%. Ou seja, o grupo com maior taxa proliferativa poderia ter maior expressão e atividade da CD73, além de prognósticos desfavoráveis, uma vez que atividades mais pronunciadas dessa enzima estariam presentes no plasma de pacientes com tumores mais ativos e mais agressivos. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Morello *et. al* (2017), que mostraram que as amostras de pacientes de melanoma estágio IV com maior atividade da CD73 possuíam piores

prognósticos [Morello *et. al*, 2017]. Loi *et. al* (2013) também demonstraram altos níveis de expressão da CD73 em pacientes com o subtipo triplo negativo de câncer de mama com piores prognósticos e resistência a antraciclina, comumente utilizadas para o tratamento da doença [Loi *et. al*, 2013]. Apesar disso, a associação da CD73 com sobrevida a longo prazo ainda é uma questão a ser debatida devido à grande heterogenicidade dos tumores de mama [Turner *et. al*, 2013], e o estudo realizado por Supernat *et. al* (2012) relata que altos níveis da CD73 podem estar relacionados à melhor sobrevida geral no caso de tumores de mama estágios I a III [Supernat *et. al*, 2012]. Porém, quando dividimos as pacientes do nosso estudo de acordo com o estágio clínico em dois grupos – o primeiro com estágios I e II (tumores menos graves) e o segundo com estágios III e IV (tumores mais agressivos), pudemos observar uma tendência a maior hidrólise de ATP e menor hidrólise de ADP no primeiro grupo. Isso sugere que a atividade ATPásica presente nos estágios iniciais, que pode estar relacionada à enzima CD39, está envolvida no desenvolvimento inicial dos tumores, quando há hipóxia e secreção acentuada de ATP. Uma alta concentração desse nucleotídeo no meio extracelular poderia recrutar células imunes ao tumor, prejudicando seu desenvolvimento [Di Virgilio *et. al*, 2018]. Já a atividade AMPásica neste caso é similar em ambos os grupos, podendo ser explicado pelo fato de que a formação de adenosina é benéfica ao tumor em qualquer estágio de desenvolvimento, já que a mesma tem conhecida ação imunossupressora, como citado anteriormente.

Mesmo diante do exposto, são necessários mais estudos com pacientes idosos. A composição corporal e mecanismos de resposta do organismo às condições, doenças e tratamentos mudam com o passar do tempo, e a população idosa cresce cada vez mais no mundo. Mesmo assim, esses pacientes são geralmente excluídos dos estudos clínicos [Tesarova *et. al*, 2016; Biganzoli *et. al*, 2016], fazendo com que haja poucas evidências com relação ao tratamento nessa população, e as decisões terapêuticas tomadas sejam baseadas na extrapolação de dados dos grupos jovens, o que não se configura um cenário ideal, uma vez que o avançar

da idade provoca alterações orgânicas em relação a características tumorais, tolerância aos tratamentos e outros riscos de mortalidade, como as diversas comorbidades associadas e polifarmácia, presentes na grande maioria dos pacientes idosos [Tesarova *et. al*, 2016; Biganzoli *et. al*, 2016; Turner *et. Al*, 2013]. Pensando nisto, analisamos as comorbidades e medicamentos utilizados por estas pacientes, e não encontramos evidências que pudessem afetar a atividade enzimática. Isso pode ser considerado um achado de grande valor, uma vez que interferências neste sentido poderiam afetar a efetividade do tratamento oncológico.

O câncer de mama nestes pacientes geralmente tem características mais favoráveis do que os apresentados por pacientes jovens em relação à expressão de receptores hormonais, grau tumoral e taxa de proliferação, mas eles são, geralmente, diagnosticados em estágios mais tardios e subtratados por preocupações por parte da equipe médica com a seleção de tratamento apropriada e a decisão de fazer ou não cirurgia [Tesarova *et. al*, 2016; Gal *et. al*, 2017], o que pode ser considerado um fato prejudicial aos pacientes. De fato, Gal *et. al* (2017) demonstraram que as características biológicas tumorais entre 65 e 75 anos e após 75 anos são bem semelhantes, mas o segundo grupo recebe menos tratamentos [Gal *et. al*, 2017].

Esse estudo reforça a necessidade de inclusão dos pacientes idosos em estudos clínicos, e a importância de conhecer melhor suas características fisiológicas para um entendimento mais completo sobre suas necessidades com relação a tratamentos e qualidade de vida. Além das características tumorais serem semelhantes às dos pacientes jovens, os idosos tendem a responder aos tratamentos de forma semelhante, mostrando que, apesar das mudanças fisiológicas já citadas, o cuidado oferecido a estes pacientes deve ser aprimorado visando a melhora na qualidade de vida deles. Antes do tratamento, a prevenção e a detecção precoce são pontos cruciais para a redução da mortalidade das mulheres idosas que sofrem de câncer de mama, e, por isso, a equipe de cuidado ao paciente, seja ela por parte dos médicos, enfermeiros e demais profissionais da saúde, deve lutar para que haja cada vez mais políticas de prevenção

e combate a esta doença tão grave e presente, desde a atenção primária até os estabelecimentos de alta complexidade, podendo, assim, melhorar o atual cenário.

5. Considerações Finais

O presente estudo teve como objetivo analisar e avaliar a hidrólise de ATP, ADP e AMP em pacientes idosas com câncer de mama no momento do diagnóstico e após 6 meses de tratamento, e compará-las a idosas sem diagnóstico de câncer.

Nossos resultados demonstraram que as pacientes diagnosticadas com câncer apresentam um perfil de hidrólise diferente das pacientes sem o diagnóstico da doença e, nas amostras coletadas após 6 meses de tratamento, o perfil de hidrólise dos nucleotídeos se assemelha muito ao perfil do grupo controle, tendo destaque a redução significativa da hidrólise de AMP, quando comparado à análise das amostras coletadas no momento do diagnóstico.

Estes resultados sugerem que a atividade das enzimas que realizam a hidrólise destes nucleotídeos está alterada na presença do câncer, possivelmente para que haja uma adaptação do microambiente tumoral às necessidades do próprio tumor, e refletindo esse ambiente na corrente sanguínea, uma vez que as amostras de sangue periférico destas pacientes apresentaram atividade enzimática alterada. Além disto, houve diferença no perfil de hidrólise da primeira para a segunda amostra, demonstrando que todos os tratamentos utilizados, sejam eles quimioterápicos, radioterápicos, cirúrgicos ou endócrinos, agiram sobre o metabolismo dos nucleotídeos, reduzindo significativamente a hidrólise do AMP.

Este estudo produziu resultados importantes para o entendimento da bioquímica tumoral nas pacientes idosas com câncer de mama e como a sinalização purinérgica age nesse processo, em uma população que é pouco incluída em estudos clínicos, mas que segue crescendo e sofrendo com doenças relacionadas à longevidade. Por isso, ainda são necessários mais estudos para aprimoramento de diagnóstico e tratamento, melhorando, assim, os desfechos dessa doença e reduzir a mortalidade dessas pacientes.

6. Perspectivas Futuras

O melhor entendimento da participação do sistema purinérgico no câncer de mama das pacientes idosas contribuiu para o aprimoramento das técnicas de diagnóstico e tratamento destas, a fim de melhorar o desfecho desta doença. Porém, muito ainda deve ser feito para enriquecer este estudo. Os próximos passos a serem realizados são importantes para que se tenha uma visão mais ampla do cenário e se consiga chegar a melhores conclusões. São eles:

- Aumentar o número de pacientes incluídas e conseqüentemente melhorar o n amostral;
- Avaliar a expressão das enzimas CD39 e CD73 em linfócitos circulantes através da técnica de PCR quantitativo nas amostras sanguíneas das pacientes com câncer de mama e nas saudáveis (controles);
- Investigar a expressão proteica das enzimas CD39 e CD73 pela técnica de imunohistoquímica em amostras de biópsia das pacientes com câncer de mama.

CAPÍTULO IV

7. Anexos

7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu FERNANDA BUENO MORRONE, responsável pela pesquisa AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO TRATAMENTO NOS PACIENTES IDOSOS COM CÂNCER DE MAMA NO HOSPITAL SÃO LUCAS DA PUCRS, estamos fazendo um convite para você participar como voluntário nesse estudo.

Esta pesquisa pretende avaliar a resposta ao tratamento utilizado e a possível existência de alguma diferença na escolha do mesmo por conta da idade do paciente. Além disso, pretendemos avaliar a progressão tumoral e a utilização e adequação de instrumento de análise de qualidade de vida desses pacientes. Ainda, esse projeto visa avaliar marcadores de senescência e de ciclo celular em pacientes idosos com câncer de mama.

Acreditamos que ela seja importante porque a população mundial está se tornando cada vez mais longeva e dessa forma necessitamos estudos para avaliar o impacto do tratamento nessa população para assim, colaboramos com medidas de saúde públicas mais adequadas e eficientes.

Para sua realização será feito o seguinte: aplicação de um questionário de exame mental, aplicação de questionário sociodemográfico, aplicação de questionário de qualidade de vida (geral, câncer de mama e idoso) e de adesão ao tratamento. Além disso, juntamente com a sua coleta de sangue de rotina (após o fim de cada ciclo de quimioterapia) feita pelo setor de enfermagem do HSL-PUCRS será coletado um tubo extra, no mesmo momento e pelo mesmo profissional, para a análise de marcadores de envelhecimento e de ciclo celular.

Sua participação constará de responder os questionários e permitir a coleta de um tubo extra no momento da coleta sanguínea de rotina.

É possível que aconteçam pequenos desconfortos ou riscos mínimos durante as entrevistas como cansaço e riscos mínimos durante a coleta sanguínea que estarão dentro dos desconfortos de rotina visto que a coleta já será realizada para acompanhamento do seu oncologista. Você tem o direito de pedir uma indenização por qualquer dano que resulte da sua participação no estudo.

Os benefícios que esperamos como estudo são um maior esclarecimento dos efeitos dos tratamentos na população idosa e longeva, além de possíveis correlações entre o tratamento e progressão do tumor. Desse modo, podemos contribuir para uma melhora da saúde pública para os idosos, gerando uma intervenção mais humanizada e melhorando a qualidade de vida dos pacientes em tratamento .

Durante todo o período da pesquisa você tem o direito de esclarecer qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato, com Fernanda B Morrone no telefone ((51) 999164726) a qualquer hora.

Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos participantes, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação.

Caso você tenha qualquer dúvida quanto aos seus direitos como participante de pesquisa, entre em contato com Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP-PUCRS) em (51) 33203345, Av. Ipiranga, 6681/prédio 50 sala 703, CEP: 90619-900, Bairro Partenon, Porto Alegre – RS, e-mail: cep@pucrs.br, de segunda a sexta-feira das 8h às 12h e das 13h30 às 17h. O Comitê de Ética é um órgão independente constituído de profissionais das diferentes áreas do conhecimento e membros da comunidade. Sua responsabilidade é garantir a proteção dos direitos, a segurança e o bem-estar dos participantes por meio da revisão e da aprovação do estudo, entre outras ações.

Ao assinar este termo de consentimento, você não abre mão de nenhum direito legal que teria de outra forma.

Não assine este termo de consentimento a menos que tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e tenha recebido respostas satisfatórias para todas as suas dúvidas.

Se você concordar em participar deste estudo, você rubricará todas as páginas e assinará e datará duas vias originais deste termo de consentimento. Você receberá uma das vias para seus registros e a outra será arquivada pelo responsável pelo estudo.

O material biológico coletado será utilizado para análises já esclarecidas acima.

Eu, _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar.

Diante do exposto expressei minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do participante da pesquisa ou de seu representante legal

Assinatura de uma testemunha

7.2 Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NOS PACIENTES IDOSOS COM CÂNCER DE MAMA NO HOSPITAL SÃO LUCAS DA PUCRS.

Pesquisador: Fernanda Bueno Morrone

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68681517.5.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.137.673

Apresentação do Projeto:

O câncer é um termo utilizado para um conjunto de doenças que se inicia pelo crescimento descontrolado de células e que é capaz de acometer quase todas as partes do corpo. Nas últimas décadas, o câncer tem se tornado um problema de saúde pública mundial e está se dirigindo a ser a principal causa de morte por doenças não transmissíveis no mundo. Com a evolução da medicina e dos tratamentos cirúrgicos, radio e quimioterápicos, a expectativa de vida da população aumentou de forma significativa e, em algumas décadas, seremos uma população muito mais idosa do que jovem. Dessa forma, se faz necessário à pesquisa em saúde pública que investigue a progressão e a resposta ao tratamento de tumores na população idosa assim como nos longevos. E não apenas esses parâmetros, mas também utilizar e verificar a qualidade de vida na velhice durante o desenvolvimento da doença e durante o seu tratamento. Desse modo, o projeto aqui proposto visa avaliar na população de pacientes idosos e longevos do Hospital São Lucas da PUCRS a qualidade de vida desses pacientes, assim como a progressão do tumor de mama e a resposta ao tratamento utilizando instrumentos previamente validados para a população brasileira.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

Continuação do Parecer 2 137 673

O proposto projeto guarda-chuva foi previamente aprovado pela Agência de Fomento CAPES e pelo Comitê Científico da Instituição para a implementação do estágio pós-doutoral no país, proveniente do Prêmio CAPES-Interfarma de 2014. Esse projeto visa realizar uma estudo de coorte prospectiva em pacientes idosos que apresentam câncer de mama, avaliando a resposta ao tratamento utilizado e a possível existência de alguma diferença na escolha do mesmo por conta da idade do paciente. Além disso, pretendemos avaliar a progressão tumoral e a utilização e adequação de instrumento de análise de qualidade de vida desses pacientes. Além disso, esse projeto fará parte de um subprojeto que visa avaliar a adesão ao tratamento quimioterápico por via oral no grupo de pacientes estudado.

Objetivo Secundário:

- 1.Determinar a prevalência de idosos com câncer de mama do ambulatório do oncologia do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS de Porto Alegre;
- 2.Verificar a associação entre as variáveis sociodemográficas e o estadiamento dos tumores entre os grupos estratificados por faixa etária;
- 3.Avaliar os exames laboratoriais ao longo do tratamento;
- 3.1Relacionar o uso de diferentes tratamentos farmacológicos aos níveis plasmáticos de marcadores oxidativos e inflamatórios entre os grupos estratificados por faixa etária;
- 4.Aplicar questionário de qualidade de vida que permitirá avaliar os seguintes parâmetros nos diferentes grupos de acordo com a faixa etária: incidência de comorbidades; progressão tumoral ao longo do tratamento; efeitos adversos durante o tratamento quimioterápico;
- 5.Analisar as interações medicamentosas;
- 6.Avaliar a adesão ao tratamento quimioterápico administrado por via oral;
- 7.Avaliar a resposta ao tratamento utilizado, comparando a quimioterapia clássica à imunoterapia; radioterapia; cirurgia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto apresenta riscos mínimos, apenas aqueles já existentes na própria rotina de tratamento do paciente.

Benefícios:

A partir do desenvolvimento deste projeto, serão obtidos dados sobre a qualidade de vida dessa população em estudo. Dessa forma, gerando informações relevantes que contribuirão para uma melhora da qualidade de vida dos paciente durante o tratamento quimioterápico e, conseqüentemente, no sucesso do tratamento. Além disso, com informações sobre o desenvolvimento e a resposta do tumor em idosos, será possível auxiliar em um melhor entendimento tumoral nos idosos.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

Continuação do Parecer 2.137.673

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas nas Resoluções CNS n° 466 de 2012, n° 510 de 2016 e Norma Operacional n° 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_894651.pdf	16/06/2017 11:12:13		Aceito
Outros	CartaRespostaPendenciasF.doc	16/06/2017 11:11:45	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Outros	CartadePendencias.pdf	12/06/2017 11:34:22	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoDeCompromissoDeUtilizacaoDeDados.pdf	12/06/2017 11:32:47	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Cronograma	CronogramaDeAtividadesAlterado.pdf	12/06/2017 11:32:06	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Outros	CartaAprovacaoCC_1490878626453.pdf	22/05/2017 14:42:37	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Outros	DocUnificadoPP_1490878626453.pdf	22/05/2017 14:42:00	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Outros	QuestionarioMiniExameDoEstadoMental.pdf	03/04/2017 17:18:33	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Outros	QuestionarioDeAdesaoAoTratamento.pdf	03/04/2017 17:17:59	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Outros	QuestionarioQLQC30.pdf	03/04/2017 17:17:42	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Outros	QuestionarioBreastCancerBR23.pdf	03/04/2017 17:17:19	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Outros	QuestionarioElderlyELD14.pdf	03/04/2017 17:16:56	Fernanda Bueno Morrone	Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703
 Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pu.rs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 2.137.673

Outros	Lattes.docx	03/04/2017 17:16:01	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaDiretorTecnicoClinico.pdf	03/04/2017 17:15:41	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	03/04/2017 17:15:15	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO2017final.pdf	03/04/2017 17:15:01	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Orçamento	OrcamentoAprovado.pdf	03/04/2017 17:14:41	Fernanda Bueno Morrone	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	03/04/2017 17:13:59	Fernanda Bueno Morrone	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 26 de Junho de 2017

Assinado por:
Paulo Vinicius Sporleder de Souza
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

CAPÍTULO V

8. Referências

- Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* (2017) 50:33. 10.1186/s40659-017-0140-9
- Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews* 2017; 276: 121-144.
- Allard B, Turcotte M, Stagg J. Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2014 Aug;18(8):863-81. doi: 10.1517/14728222.2014.915315.
- Al-Rashida M, Iqbal J. Inhibition of Alkaline Phosphatase: An Emerging New Drug Target. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2015, 15, 41-51.
- American Joint Committee on Cancer. Breast. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017:589.
- Antonioli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, Haskó G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer.* 2016 February 1; 2(2): 95–109. doi:10.1016/j.trecan.2016.01.003.
- Araújo MC, Rocha JB, Morsch A, Zanin R, Bauchspiess R, Morsch VM, Schetinger MR. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jun 10;1740(3):421-6.
- Azimi I, Beilby H, Davis FM, Marcial DM, Kenny PA, Thompson EW, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Altered purinergic receptor-Ca²⁺ signaling associated with hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Mol Oncol.* 2016 Jan; 10(1): 166–178.
- Bagaria SP, Ray PS, Sim MS, Ye X, Shamonki JM, Cui X, Giuliano AE. Personalizing Breast Cancer Staging by the Inclusion of ER, PR, and HER2. *Jama Surg.* 2014;149(2):125-129. Doi: 10.1001/jamasurg.2013.3181
- Barginear MF, Muss H, Kimmick G, Owusu C, Mrozek E, Shahrokni A, Ballman K, Hurria A. Breast cancer and aging: results of the U13 conference breast cancer panel. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jul;146(1):1-6. doi: 10.1007/s10549-014-2994-7. Epub 2014 May 22.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AMO. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line

proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, (2008). 319(1-2), 61–68. doi:10.1007/s11010-008-9877-3

Becker LV, da Silva Pereira Saccol R, Morsch VM, Leal DBR, Casali EA, Lopes NGM, Cardoso VV, Schetinger MRC. Activity and expression of E-NTPDase is altered in peripheral lymphocytes of systemic lupus erythematosus patients. *Clin Chim Acta*. 2019 Jan;488:90-97. doi: 10.1016/j.cca.2018.10.032.

Biganzoli L, Wildiers H, Oakman C, Marotti L, Loibl S, Kunkler I, Reed M, Ciatto S, Voogd AC, Brain E, Cutuli B, Terret C, Gosney M, Aapro M, Audisio R. Management of elderly patients with breast cancer: updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG) and European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA). *Lancet Oncol* 2012; 13: e148–60.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta Nº 04, de 23 de Janeiro de 2018. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama. Consultado em 03 de novembro de 2018. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/07/PORTARIA-no-04-PCDT.carcinoma.mama.2018.pdf>

Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 661.

Burnstock, G, Di Virgilio, F. Purinergic signalling in cancer. *Purinergic Signal* 2013. 9, 491–540. doi: 10.1007/s11302-013-9372-5

Cai XY, Ni XC, Yi Y, et al. Overexpression of CD39 in hepatocellular carcinoma is an independent indicator of poor outcome after radical resection. *Kapritsou. M, ed. Medicine*. 2016;95(40):e4989.

Cai XY, Wang XF, Li J, Dong JN, Liu JQ, Li NP, Yun B, Xia RL, Qin J, Sun YH. High expression of CD39 in gastric cancer reduces patient outcome following radical resection. *Oncol Lett*. 2016 Nov;12(5):4080-4086. Epub 2016 Sep 26.

Cappellari AR, Pillat MM, Souza HD, Dietrich F, Oliveira FH, Figueiró F, Abujamra AL, Roesler R, Lecka J, Sévigny J, Battastini AM, Ulrich H. Ecto-5'-Nucleotidase Overexpression Reduces Tumor Growth in a Xenograph Medulloblastoma Model. *PLoS One*. 2015 Oct 22;10(10):e0140996. doi: 10.1371/journal.pone.0140996. eCollection 2015.

De Souza Timoteo AR, Gonçalves AÉMM, Sales LAP, Albuquerque BM, Souza JES, Moura PCP, Aquino MAA, Agnez-Lima LF, Lajus TBP (2018). A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. doi:10.1007/s10549-018-4938-0

Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2018. Doi:10.1038/s41568-018-0037-0.

Dietrich F, Figueiró F, Filippi-Chiela EC, Cappellari AR, Rockenbach L, Tremblay A, Paula PB, Roesler R, Braga Filho A, Sévigny J, Morrone FB, Battastini AMO. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 contributes to the radiosensitivity of T24 human bladder cancer cell line. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Mar;144(3):469-482. doi: 10.1007/s00432-017-2567-3

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, (editors). *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th edition. France: Springer; 2010. Available from: <http://www.springer.com/medicine/surgery/book/978-0-387-88440-0>

Ervik M, Lam F, Ferlay J, Mery L, Soerjomataram I, Bray F (2016). *Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>, accessed 21/10/2017.

Ferrari D, Malavasi F, Antonioli L. A Purinergic Trail for Metastases. *Trends in Pharmacological Sciences*, March 2017, Vol. 38, No. 3.

Gardani CFF, Cappellari AR, Souza JB, Silva BT, Engroff P, Moritz CEJ, Scholl JN, Battastini AMO, Figueiró F, Morrone FB. Hydrolysis of ATP, ADP and AMP are increased in blood plasma of prostate cancer patients. *Purinergic Signal* 2019. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9642-3>.

Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol Lett*. 2018 Nov 12. pii: S0165-2478(18)30354-7. doi: 10.1016/j.imlet.2018.11.006.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology* 24: 2206–2223, 2013.

Hoskin DW, Reynolds T, Blay J. Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumours. *Int J Cancer* (1994) 59:854–855

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

International Breast Cancer Study Group, Rudenstam CM, Zahrieh D, Forbes JF, Crivellari D, Holmberg SB, Rey P, Dent D, Campbell I, Bernhard J, Price KN, Castiglione-Gertsch M, Goldhirsch A, Gelber RD, Coates AS. Randomized trial comparing axillary clearance versus no axillary clearance in older patients with breast cancer: first results of International Breast Cancer Study Group Trial 10-93. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 20;24(3):337-44.

Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *The Journal of Immunology* April 1, 1991, 146 (7) 2235-2244.

Koleva-Kolarova RG; Daszczuck AM; de Jonge C; Hantash MKA; Zhan ZZ; Postema EJ; Feenstra TL; Pijnappel RM; Greuter MJW; de Bock GH. A modelling study to evaluate the costs and effects of lowering the starting age of population breast cancer screening. *Maturitas* 109 (2018)81-88.

Jiang ZG, Wu Y, Csizmadia E et al. Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ecto-nucleotidases in human plasma. *Purinergic Signal* (2014) 10:611–618. doi: 10.1007/s11302-014-9423-6.

Loi S, Pommey S, Haihe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, Stagg J. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):11091-6. doi: 10.1073/pnas.1222251110.

Love RR, Love SM, Laudico AV. Breast cancer from a public health perspective. *Breast J*. 2004;10:136–40

Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MIA, Lenz G, Battastini AMO. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer* 2006; 23: 226.

Namasivayam V, Lee SY, Müller CE. The promiscuous ectonucleotidase NPP1: molecular insights into substrate binding and hydrolysis. *BiochimBiophysActa*. 2017 Mar;1861(3):603-614.

National Cancer Institute at the National Institutes of Health (NIH). Breast Cancer Treatment (PDQ®)—Health Professional Version, 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>>. Acessado em 29 out. 2018

Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103:13132–13137

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* (2006) 2:409–430. DOI 10.1007/s11302-006-9003-5

Roder D, Farshid G, Kollias J, et al. Female breast cancer management and survival: The experience of major public hospitals in South Australia over 3 decades—trends by age and in the elderly. *J EvalClinPract*. 2017;1–11. <https://doi.org/10.1111/jep.12819>

Santos AA Jr, Cappellari AR, de Marchi FO, Gehring MP, Zaparte A, Brandão CA, Lopes TG, da Silva VD, Pinto LFR, Savio LEB, Moreira-Souza ACA, Coutinho-Silva R, Pácez JD, Zerbini LF, Morrone FB. Potential role of P2X7R in esophageal squamous cell carcinoma proliferation. *Purinergic Signal*. 2017 Sep;13(3):279-292. doi: 10.1007/s11302-017-9559-2.

Santos KF, Gutierrez JM, Pillat MM, Rissi VB, Santos Araújo MD, Bertol G, Gonçalves PB, Schetinger MR, Morsch VM. Uncaria tomentosa extract alters the catabolism of adenine nucleotides and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and P2X7 and A1 receptors in the MDA-MB-231 cell line. *J Ethnopharmacol*. 2016 Dec 24;194:108-116. doi: 10.1016/j.jep.2016.08.051.

Saraiva DP, Cabral MG, Jacinto A, Braga S. How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment. *ESMO Open*. 2017; 2(4): e000208.

Sashindranath M, Dwyer KM, Dezfouli S, et al. Development of a novel strategy to target CD39 antithrombotic activity to the endothelial-platelet microenvironment in kidney ischemia-reperfusion injury. *Purinergic Signal*. 2017;13(2):259-265.

Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, Harasymczuk M, Mandapathil M, Lang S, Jackson EK, Whiteside TL. Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin Exp Immunol*. 2014 Aug;177(2):531-43. doi: 10.1111/cei.12354.

Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zackrisson S, Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, Volume 26, Issue suppl_5, 1 September 2015, Pages v8–v30, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv298>

Spungin B, Friedberg I. Growth inhibition of breast cancer cells induced by exogenous ATP. *J Cell Physiol*. 1993 Dec;157(3):502-8.

Spychala, J. (2000). Tumor promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* 87, 161–173

Stewart, BW; Wild, CP. (Ed.). *World Cancer Report: 2014*. Lyon: IARC, 2014.

Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J, Czapiewski P, Biernat W, Zaczek A. CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012 Mar;20(2):103-7

Tesarova, P. Specific Aspects of Breast Cancer Therapy of Elderly Women. *BioMed Research International*, 2016:1381695. doi: 10.1155/2016/1381695

Theodoraki MN, Hoffmann TK, Jackson EK, Whiteside TL. Exosomes in HNSCC plasma as surrogate markers of tumour progression and immune competence. *Clin Exp Immunol*. 2018 Oct;194(1):67-78. doi: 10.1111/cei.13157.

Turner, N; Zafarana E; Becheri, D; Mottino, G; Biganzoli, L. Breast Cancer in the Elderly: Which Lessons Have We Learned? *Future Oncol*. 2013; 9(12):1871-1881.

Wilhelm K, Ganesan J, Muller T, Durr C, Grimm M, Beilhack A, Krempf CD, Sorichter S, Gerlach UV, Juttner E, Zerweck A, Gartner F, Pellegatti P, Di Virgilio F, Ferrari D, Kambham N, Fisch P, Finke J, Idzko M, Zeiser R. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* (2010) 16:1434–1438

Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, Sévigny J, Battastini AMO, Robson SC. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience*, 138 (2006), pp. 421-432. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.039>

Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AM. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett.* 2003 Aug 20;198(2):211-8.

Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014; 49(6): 473–497

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783 (2008) 673–694.

Yu, J, Liao, X, Li, L et al. A preliminary study of the role of extracellular 5'-nucleotidase in breast cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* (2017) 53: 132. doi:10.1007/s11626-016-0089-y.

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signal*. 2012 Sep;8(3):437-502.