

Câncer de mama e sistema purinérgico

Ângelo Pereira de Lacerda
Heitor Silvino Gonzaga
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

LACERDA, Â. P., GONZAGA, H. S., and MACIEL, S. F. V. O. Câncer de mama e sistema purinérgico. In: CARDOSO, A. M., MANFREDI, L. H., and MACIEL, S. F. V. O., eds. *Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas* [online]. Chapecó: Editora UFFS, 2021, pp. 138-155. ISBN: 978-65-86545-47-0. <https://doi.org/10.7476/9786586545494.0008>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

CÂNCER DE MAMA E SISTEMA PURINÉRGICO

*Ângelo Pereira de Lacerda
Heitor Silvino Gonzaga
Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel*

INTRODUÇÃO

Avanços recentes nas pesquisas relacionadas ao câncer têm mostrado os mecanismos de expansão e proliferação tumoral, principalmente relacionados ao sistema purinérgico. Todas as células do sistema imune e também as células tumorais expressam receptores de membrana para nucleosídeos e nucleotídeos, sendo eles adenosina (ADO), ATP e ADP, respectivamente. Além disso, uma característica marcante do microambiente tumoral é a concentração extremamente alta de ATP e ADO extracelular. Ambos modulam as respostas do tumor e do hospedeiro, em que, dependendo do receptor ativado por elas, medeiam-se respostas imunossupressoras ou imunoestimulação relacionada ao hospedeiro, podendo ocorrer a citotoxicidade no tumor ou seu crescimento (Di Virgilio *et al.*, 2017).

Em relação ao câncer de mama (CM), análises de expressão gênica mostram que células das linhagens de CM MCF7 e Hs578T têm expressão predominante de receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 (Qiu *et al.*, 2018). E há dados pré-clínicos que mostram que receptores metabotrópicos do sistema purinérgico tipo P2Y podem dar suporte à invasão e metástase, promovendo a migração do câncer, sendo que o receptor P2Y2 exerce um papel fundamental na disseminação metastática, por estar altamente expresso nesse tipo de câncer (Di Virgilio *et al.*, 2017). Entretanto, a linhagem celular de CM, MDA-MB-231 não expressa

receptores de ATP, sendo necessárias mais pesquisas relacionadas aos diferentes tipos de linhagens celulares de CM. Também já é demonstrado que o bloqueio das ações de nucleotídeos no CM recém-diagnosticado pode complementar o tratamento padrão antiangiogênese (Buxton *et al.*, 2010).

Neste capítulo, serão tratados aspectos gerais do CM, além dos específicos relacionados ao sistema purinérgico, abordando questões do funcionamento da modulação do microambiente tumoral, sua metástase e potenciais terapias que utilizam os receptores do sistema purinérgico como alvos.

Câncer de mama (CM)

Segundo o Ministério da Saúde (INCA, 2018), o CM é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo em mulheres, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Segundo Bray *et al.* (2018), aproximadamente 2,08 milhões de mulheres foram diagnosticadas com CM no mundo; destas, 626.000 mortes foram decorrentes da doença. Para o ano de 2018, a estimativa era de 59.700 novos casos de CM no Brasil, correspondendo a cerca de 30% de todos os casos de câncer em mulheres. Em 2015, foram notificadas 15.403; em 2016, 16.254 mortes, respectivamente, devido à neoplasia maligna da mama (Brasil, 2017). Devido a melhorias no diagnóstico e no tratamento da doença, a taxa de sobrevivência aumentou em 5 anos, e está entre 80 e 92% nos Estados Unidos (Siegel, Miller, Jemal, 2015). Porém, essa taxa diminuiu com o nível de agressividade do tumor (Berghuis *et al.*, 2017).

O CM na mulher tem etiologia multifatorial: idade acima dos 50 anos, com o dobro do risco após os 65 anos; história familiar e genética, como alterações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*; menarca antes dos 12 anos e menopausa após os 55 anos; nuliparidade; primeira gravidez após os 30 anos; obesidade e sobrepeso; sedentarismo e inatividade física; consumo de bebidas alcoólicas; exposição frequente à radiação ionizante; e história prévia de doenças benignas da mama (Bilimoria, Morrow, 1995; Kumar *et al.*, 2008; Inca, 2016).

Os carcinomas mamários são divididos em invasivos, quando ultrapassam o limite da membrana basal, e em não-invasivos (*in situ*), quando não ultrapassam. Podem também ser classificados conforme o tipo histológico específico: ductal, lobular, medular, mucinoso, tubular e outros tipos. Dentre eles, o carcinoma ductal

in situ é o tumor mais comum não invasivo, e o carcinoma ductal invasivo é o tumor invasivo mais comum, que corresponde a 70-80% dos casos (Kumar *et al.*, 2008). Ainda de acordo com a avaliação histológica dos tumores de mama, eles podem ser divididos em pouco, moderadamente ou bem diferenciados. Tumores pouco diferenciados apresentam mais resistência ao tratamento (Le Doussal *et al.*, 1989; Dillon *et al.*, 2014).

Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), o CM pode ser classificado em até 21 tipos histológicos, com base na morfologia celular, crescimento e organização celular. O tipo histológico mais comum é o carcinoma ductal invasivo sem tipo especial, que inclui aqueles cânceres sem características peculiares para merecerem uma classificação diferenciada (Dieci *et al.*, 2014), devido à expressão de seus genes serem semelhantes com a do tecido epitelial normal da mama (Rivenbark, O'Connor, Coleman, 2013). Alguns tipos especiais, como o carcinoma lobular invasivo, representam 25% de todos os cânceres de mama (Dieci *et al.*, 2014). O conhecimento de qual subtipo o tumor pertence, somado a marcadores clínicos e patológicos, é útil para explicar as características e a evolução da doença, além de apontar a melhor terapêutica para cada caso específico (Melichar, 2013).

Os detalhamentos das características do tumor são possíveis graças aos biomarcadores (Nalejska, Mącznyńska, Lewandowska, 2014), que estão bastante difundidos na oncologia clínica e no CM. Os biomarcadores já definidos são: receptor de estrogênio (RE); receptor de progesterona (RP); receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2); antígeno carcinoembrionário (CEA); e CA 15-3 (Berghuis *et al.*, 2017). Entretanto, devido à diversidade genética da doença, novos biomarcadores estão sendo estudados (Prat, Perou, 2011). Com base na imuno-histoquímica (IHQ), o CM consiste em, pelo menos, três grupos principais: receptor de hormônio (HR) positivo (inclui RP e RE); HER2 positivo; e triplo-negativo (HR e HER2 negativos) (Dieci *et al.*, 2014).

Nos pilares do tratamento para o CM, estão a remoção cirúrgica do tumor, juntamente com quimioterapia e radioterapia. De forma complementar, a intervenção hormonal é a principal terapia direcionada a tumores HR-positivos; agentes anti-HER2 (como o Trastuzumabe), somados à quimioterapia ou terapia endócrina, são o tratamento padrão para tumores com superexpressão de HER2. A quimioterapia representa o único método de tratamento, além do cirúrgico,

para cânceres de mama triplo-negativo, porque nenhuma terapia direcionada está disponível até o momento (Prat *et al.*, 2015).

Estudos de expressão gênica em tumores de mama propuseram subtipos moleculares baseados em diferentes perfis de expressão gênica, os subtipos intrínsecos do CM. Identificou-se, inicialmente, cinco subgrupos com prognósticos e sensibilidades diferentes aos tratamentos: luminal (A e B), HER2 enriquecido, basal, *claudin-low*, e um grupo semelhante ao normal. (Sørлие *et al.*, 2001; Sørлие *et al.*, 2003; Dieci *et al.*, 2014; Prat *et al.*, 2015). No estudo de Farmer *et al.* (2005), foi proposto o subtipo apócrino molecular, o qual apresenta aumento da sinalização androgênica. Um outro subtipo, rico em interferon, caracterizado pela superexpressão de genes regulados pelo interferon, foi descrito em 2006 por Hu e colaboradores.

Tumores HR positivos agrupam-se principalmente dentro do subtipo luminal, que pode ser dividido em dois subtipos – Luminal A e Luminal B. O subtipo Luminal A caracteriza-se pela alta positividade para RE e RP, pela ausência de amplificação ou superexpressão de HER2, e pela avaliação do marcador Ki-67 (índice de proliferação tumoral calculado por anticorpo, que marca os núcleos de células que estão em qualquer fase do ciclo celular) menor do que 14%, sendo sensível à hormonioterapia, com o melhor prognóstico dentre os subtipos intrínsecos. O subtipo Luminal B é positivo para RE, tem amplificação de HER2, e Ki-67 maior do que 14%, com um prognóstico intermediário (Prat e Perou, 2011). O tratamento adjuvante para este subtipo tumoral pode ocorrer por terapias antiestrogênicas, assim como se pode utilizar a droga trastuzumabe, anticorpo monoclonal que tem como alvo tumores com superexpressão de HER2 (Harrell *et al.*, 2012; Goldhirsch *et al.*, 2013). Tumores HER2+/HR- agrupam-se principalmente dentro do subgrupo HER2 enriquecido (que não expressam RE). Os tumores triplos negativos, estão contidos no subtipo basal e *claudin-low*, os quais têm origem em células-tronco ou células luminiais indiferenciadas. Por serem pouco diferenciados, os tumores de mama triplo negativos têm poucas possibilidades terapêuticas e, por isso, apresentam um prognóstico reservado (Prat e Perou, 2009; Barros e Leite, 2015; Prat *et al.*, 2015).

Na avaliação do CM, o estadiamento clínico é primordial, e o sistema TNM do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) é o mais utilizado, onde T avalia o tamanho tumoral e o grau de invasão local, N avalia o envolvimento de linfonodos regionais, e M avalia a existência de metástases a distância (Tabela 1). Na

maioria das vezes, as células do tumor de mama se disseminam inicialmente para os linfonodos axilares. De acordo com a *American Cancer Society*, o linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo que recebe a drenagem linfática derivada do tumor. Sua biópsia é a forma mais comum e menos invasiva de predizer se houve disseminação do câncer para a axila, e sua detecção é necessária não somente para verificar a disseminação do tumor para a axila, mas também para evitar a linfadenectomia axilar total em pacientes sem comprometimento metastático em linfonodos. Caso o linfonodo sentinela esteja comprometido, os linfonodos seguintes serão avaliados; caso o linfonodo sentinela esteja preservado, é sinal de que não há disseminação proximal (Giuliano *et al.*, 2017).

Tabela 1. Estágios do CM

Estágios	TNM
Estágio 0	Tis, N0, M0
Estágio IA	T1, N0, M0
Estágio IB	T0 ou T1, N1mi, M0
Estágio IIA	T0 ou T1, N1, M0; T2, N0, M0
Estágio IIB	T2, N1, M0; T3, N0, M0
Estágio IIIA	T0 a T2, N2, M0; T3, N1 ou N2, M0
Estágio IIIB	T4, N0 a N2, M0
Estágio IIIC	Qualquer T, N3, M0
Estágio IV	Qualquer T, Qualquer N, M1

Fonte: Giuliano *et al.* (2017) – adaptada.

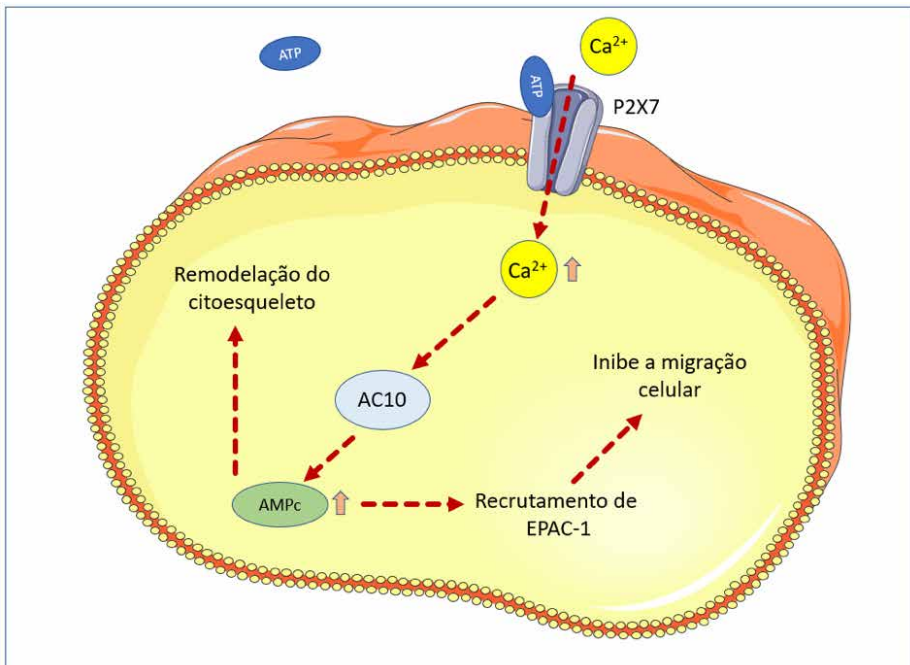
- * Estadiamento do CM baseado na classificação TNM. Tis: carcinoma ductal in situ; T0: sem evidência de tumor primário; T1: tumor menor que 2 cm de diâmetro; T3: tumor entre 2 e 5 cm de diâmetro; tumor de qualquer tamanho que invadiu o tórax ou a pele (ulceração ou nódulos macroscópicos). N0: sem metástases em linfonodos regionais; N1mi: micrometástases (aproximadamente 200 células, maior que 0,2 mm e menor que 2,0 mm); N1: Disseminação para 1 ou 3 linfonodos axilares e/ou mamários internos; N2: Disseminação para 4 ou 9 linfonodos axilares e/ou mamários internos; N3: disseminação para 10 ou mais linfonodos axilares ou disseminação para linfonodos subclaviculares. M0: sem evidência clínica ou radiológica de metástases à distância; M1: Metástases distantes detectável clínica ou radiologicamente.

Sistema Purinérgico e Câncer

A sinalização purinérgica está envolvida na inflamação e no câncer, isso porque o ATP extracelular se acumula no interstício do tumor (Di Virgilio *et al.*, 2017). A ativação dos receptores P2X7 e P2Y11 pela alta concentração de ATP, > 20 μM (a concentração em tecidos saudáveis está abaixo de 1 a 5 μM), inibe a migração de células endoteliais derivadas do tumor, e melhora a atração de pericitos. O aumento da atração dos pericitos leva a uma diminuição da permeabilidade endotelial, marcando a normalização do vaso. Existem dois mecanismos que explicam este processo: a alta concentração extracelular de ATP estimula os receptores P2X7 e P2Y11. O feito da ligação do ATP em P2X7 é a entrada de cálcio (Ca^{2+}) para a célula, e, em P2Y11, a ação do ATP ativa a produção de Inositol 3-fosfato (InsP3) pela proteína Gq e PCL beta. O InsP3 age em receptores IP3 no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de Ca^{2+} para o citosol. Portanto, esses dois mecanismos distintos levam a um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático, que, por sua vez, ativa a adenilil ciclase 10 (AC10), resultando em um aumento de Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, que conduz a remodelação do citoesqueleto. A elevada concentração de AMPC também recruta a Proteína de Troca Diretamente Ativada pelo AMPC (EPAC-1), que medeia o efeito inibitório sobre a migração de células tumorais de CM, o que se verifica na Figura 1 (Avanzato *et al.*, 2016). Portanto, a ativação dos

receptores P2X7 e P2Y11 inibe a migração de células tumorais da mama, sendo um dos mecanismos contra o desenvolvimento de metástases e que poderá ser alvo de terapias na prevenção de metástases mamárias.

Figura 1: Ativação do receptor P2X7 pelo ATP extracelular em célula tumoral de CM



Fonte: Avanzato *et al.* (2016) – adaptada.

- * A ativação do receptor P2X7 pelo ATP promove a entrada de Ca^{2+} para o meio intracelular, que se liga à enzima AC10, resultando no aumento de AMPc intracelular. A concentração elevada de AMPc induz a remodelação do citoesqueleto e inibe a migração das células de CM.

Concentrações elevadas de ATP inibem seletivamente a migração e a tubulogênese de células tumorais endoteliais de carcinoma de mama, mas não de células endoteliais normais, sendo que doses mais baixas são ineficazes. A tubulogênese é a base biológica para as funções de transporte tubular. Consiste em um processo complexo de organização da arquitetura epitelial e precisa de uma

coordenação refinada de vários processos celulares e moleculares. Entre eles, destacam-se a mitose, apoptose, polarização, diferenciação, adesão, motilidade, organização do citoesqueleto, proteólise e uma série de vias de sinalização intracelular (Karihaloo *et al.*, 2005). Em particular, a baixa afinidade de P2X7 para ATP fornece uma boa correlação mecanicista com a evidência de que apenas altas concentrações de ATP inibem a migração de células tumorais no CM (Avanzato *et al.*, 2016).

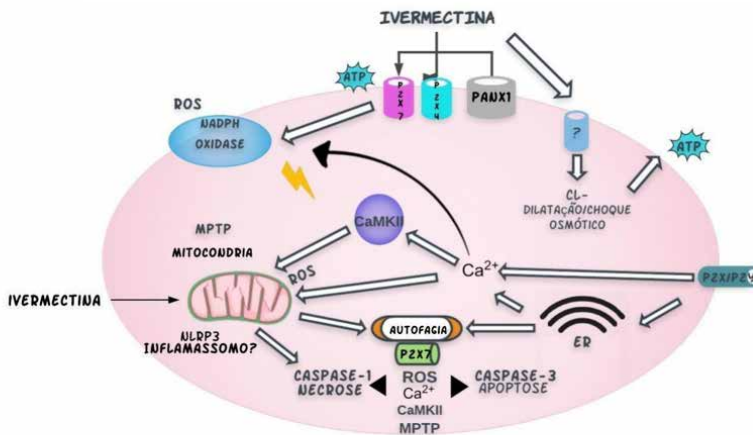
Efeitos opostos do ATP e da Sinalização Purinérgica

O ATP extracelular está envolvido em processos de defesa e reparo tecidual via sinalização dos receptores purinérgicos P1, P2X e P2Y. Altas concentrações de ATP estão associadas a fortes respostas inflamatórias e morte celular (Burnstock e Verkhratsky, 2010). Porém, a sinalização por P2X7 foi descrita associada ao crescimento tumoral e à metástase. Dessa forma, é possível perceber um papel duplo do ATP nas funções das células, ou seja, ele pode atuar tanto como um sinal imuno ativador quanto atuar na progressão do câncer (Draganov *et al.*, 2015).

A alta concentração de ATP é uma das características do microambiente tumoral, e o ATP e a sinalização purinérgica desempenham funções diversas e muitas vezes opostas, como muitas das funções complexas do microambiente tumoral. O crescimento e a sobrevivência do tumor parecem depender dos altos níveis de ATP exógeno, equilibrando as funções citotóxicas e pró tumorais (Draganov *et al.*, 2015).

Por isso, o uso de moduladores dos receptores purinérgicos estão sendo estudados como possíveis medidas terapêuticas para o câncer. Contudo, a utilização de agonistas de P2X7, como moléculas sintéticas que mimetizam o ATP, Adenosina 5'-O-(3-Tio)trifosfato (ATP γ S) ou 2'(3')-O-(4-Benzoilbenzoil) adenosina 5'-trifosfato trimetilamônio (Bz-ATP), é difícil de ser estudada, devido à toxicidade sistêmica e falha em alavancar as concentrações elevadas de ATP encontradas no microambiente tumoral, muito devido à degradação por ATPases extracelulares. Tendo isso em vista, alguns estudos utilizaram Ivermectina, um antiparasitário que está associado a uma atividade antitumoral, como modulador alostérico dos receptores purinérgicos, conforme mostra a Figura 2 (Draganov *et al.*, 2015).

Figura 2: Ativação dos receptores P2X4/P2X7/PANEXINA-1 pela Ivermectina e suas ações intracelulares



Fonte: Draganov *et al.* (2015) – adaptada.

- * Modelo de indução dos canais P2X4 e P2X7 dependentes de Pannexin-1 pela Ivermectina, a qual também induz a liberação de ATP, levando à morte da célula tumoral de CM. A sinalização aumentada do receptor P2X7 promove um mecanismo necrótico/piroptótico de rápida progressão, fomentado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas por NADPH oxidases, ativação citosólica de Ca^{2+} /CaMKII e MPTP, e caracterizado pela clivagem da caspase-1. A necrose é seguida por um programa de morte celular apoptótica progressivo mais lento, mediado por ativação de caspase-3. Os danos mitocondriais, estresse de ER, bem como o potencial esgotamento das reservas celulares de ATP, promovem, simultaneamente, a autofagia, que torna ainda mais lenta a via apoptótica.

A Ivermectina estimula a sinalização de P2X4/P2X7/Pannexina-1 e promove um desequilíbrio da dupla função purinérgica, contribuindo para a morte de células cancerosas. O mecanismo ocorre através da abertura aumentada de Pannexin-1 controlados por P2X4/P2X7, que induzem morte das células cancerosas

através de um modo misto entre apoptose e necrose associado, com ativação da Caspase-1 e piroptose (morte celular programada em resposta a infecções intracelulares, ativadas por INF- γ , e via caspase 1). A Ivermectina é capaz de matar células de CM triplo negativos em camundongos e humanos, através da sinalização P2X7 aumentada. Como o ATP desempenha um papel proeminente na regulação do volume celular e promove a morte das células cancerosas em resposta ao estresse hipotônico, supôs-se que a Ivermectina mata células cancerosas, em parte, aumentando a sensibilidade do P2X7 ao ATP, de modo que conduziria à morte celular por mecanismos apoptóticos e não apoptóticos (Draganov *et al.*, 2015).

A morte de células cancerosas depende da liberação de ATP e sinais de morte mediados por P2X7. O P2X7 pode ser revertido por radicais ativos de oxigênio gerados por NADPH oxidases, proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (caMKII) ou por poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A Ivermectina induz autofagia e liberação de ATP e proteína do grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1), importantes mediadores da inflamação. A sinalização potenciada de P2X4/P2X7 está quase que exclusivamente ligada ao microambiente tumoral, pois é rico em ATP, o que explica a seletividade tumoral da modulação de receptores purinérgicos (Draganov *et al.*, 2015).

Motilidade Celular

Algumas ectonucleotidases acopladas à membrana, como a ecto-nucleotídeo pirofosfatase (ENPP1), hidrolisam o ATP diretamente a ADO, que, por sua vez, estimula os receptores A1, A2A, A2B e A3. O receptor A3 é responsável por quimiotaxia e motilidade de neutrófilos, células epiteliais mamárias humanas benignas (HMEC) e células de CM. Nos neutrófilos e nas HMEC, os receptores A3 estão expressos de forma moderada e se concentram em um polo da célula. Entretanto, nas células de CM, MDA-MB-231, altamente metastáticas, os receptores A3 estão superexpressos e se encontram distribuídos por toda a célula. Além disso, as células MDA-MB-231 superexpressam ectonucleotidases ENPP1 e ecto-5' nucleotidase (CD73), que convertem ATP extracelular à ADO, que estimula os receptores A3, responsáveis pela migração celular (Ledderose *et al.*, 2016).

Dessa forma, poderia-se pensar que a estimulação de A3 contribuiria para a alta taxa de metástase das células MDA-MB-231, visto que a estimulação desse

receptor nos neutrófilos e HMEC promovem a migração celular. No entanto, em um estudo recente (Ledderose *et al.*, 2016), a ADO exógena adicionada a células de câncer da mama ou o agonista do receptor A3, adenosina-5'-N-metiluronamida (IB-MECA), interromperam de forma dependente da dose a motilidade celular por estimulação simultânea dos receptores, reduzindo a velocidade de migração em 75%. A justificativa para essa redução da motilidade celular foi a distribuição dos receptores A3 nas células cancerosas. Como eles estão distribuídos por toda a célula, a estimulação simultânea solicita sua migração em direções opostas, e o resultado é uma inibição da motilidade. Esse processo funciona como uma soma vetorial, em que as forças opostas se anulam.

O motivo da alta taxa de metástases da linhagem de CM, MDA-MB-231, está relacionado a níveis mais altos de ATP e maior atividade de P2Y2 do que a linhagem de CM menos metastática, MCF-7, ou a células epiteliais e endoteliais normais (ECs) sob condições normóxica e hipóxica. A ativação de P2Y2 por ATP liberado de células MDA-MB-231 induziu hipóxia pela expressão do fator-1 α hipóxia indutor, secreção de lisil oxidase e colágeno, gerando um microambiente propício para formação de um nicho pré-metastático (Eun *et al.*, 2015).

O P2Y2 é um receptor purinérgico acoplado à proteína Gq, ativado tanto pelo ATP como por UTP. A ativação de P2Y2 também contribui com a progressão de cada etapa do processo de metástase, incluindo angiogênese, intravasamento, invasão e crescimento tumoral. Esse receptor purinérgico ativa várias vias de sinalização intracelular, promovendo a mobilização de Ca²⁺ intracelular e fosfolipase C (PLC), e ativação da proteína quinase C (PKC). O receptor P2Y2 interage com as integrinas α V β 3/5 para regular as atividades da Pequena GTPase pertencente à família Ras (Rho) e a Rho quinase (ROCK), proteínas que interagem com o citoesqueleto e regulam o movimento celular. Ademais, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) também é um fator essencial na progressão tumoral e metástase, pois atua elevando significativamente a liberação de ATP nas células altamente metastáticas de CM, MDA-MB-231 e SK-BR-3 (Eun *et al.*, 2015).

No estudo de Eun *et al.* (2015), as células MDA-MB-231 e SK-BR-3, linhagens metastáticas, apresentaram maior taxa de invasão que células das linhagens de CM, MCF-7 e T47D, não metastáticas, em um nível basal, o que foi abolido através do nocaute de P2Y2 ou da presença de apirase, uma enzima que hidrolisa nucleotídeos extracelulares. Células MDA-MB-231 também mostraram altos níveis de marcadores mesenquimais, como Caracol, Vimentina e N-caderina,

mas não o marcador epitelial E-caderina, e essa expressão foi inibida através da degradação de ATP ou nocaute de P2Y2. Além disso, as células SK-BR-3 e MDA-MB-231 exibiram níveis de fosforilação da Quinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK) e PKC mais elevados do que as células T47D e MCF-7, e os níveis de fosfo-ERK e -PKC supra regulados em células MDA-MB-231 foram significativamente reduzidos por apirase ou nocaute de P2Y2. Inibidores específicos de ERK, PKC e PLC reduziram significativamente a invasão e os níveis de expressão de marcadores mesenquimais em células MDA-MB-231. Esses resultados sugerem que as vias de ERK e PKC superativadas estão envolvidas na invasão metastática mediada por P2Y2 de células de CM.

O receptor P2Y2 também está envolvido na invasão de células de CM através do eixo P2Y2-b catenina. Assim, o bloqueio do receptor P2Y2 poderia suprimir o potencial invasivo e metastático das células do CM, podendo servir como alvo potencial para intervenções terapêuticas no CM (Zhang *et al.*, 2017).

De forma análoga, o receptor P2X7 também está envolvido na invasão e migração de células de CM através da via da Proteína Quinase B (AKT), que está relacionada à síntese proteica, proliferação e motilidade celular. Esse receptor é estimulado pelo ATP e pelo seu análogo Bz-ATP, mas não pelo ADP, e está superexpresso nas células de CM, T47D. No estudo de Xia *et al.* (2015), altas concentrações de ATP extracelular atuando em P2X7 estimularam a migração e invasão das células T47D, regularam negativamente o nível da proteína E-caderina e elevaram a produção de MMP-13 (colagenase de regulação complexa relacionada com a degradação da matriz extracelular). Esses resultados revelam que essas vias podem estar relacionadas com metástases em CM e ainda mostram um possível potencial terapêutico (Eun *et al.*, 2015).

Portanto, é conhecido que os receptores purinérgicos P2Y2, P2X7 e o receptor A3 de ADO estão intimamente relacionados com a motilidade e migração de células de CM. Os receptores estão altamente expressos em tipos celulares do câncer mamário e são ativados pelas altas concentrações de seus agonistas, endógenos ou exógenos.

Hipóxia e Câncer

A causa de hipóxia, um estado de baixo teor de oxigênio nos tecidos orgânicos, é atribuída a diversos fatores, como qualquer alteração nos mecanismos de transporte de oxigênio. Em estudos com linhagens celulares, são utilizados aparelhos que simulam a redução inspirada de oxigênio (Oliveira *et al.*, 2017).

O microambiente de muitos cânceres tem a presença característica de hipóxia, podendo desencadear a transição epitelial-mesenquimal, onde as células adquirem fenótipo mais invasivo e com maior sobrevida. O tratamento com hipóxia (1% O₂) está relacionado à redução significativa na sensibilidade das células metastáticas de CM, MDA-MB-468, ao ATP, sendo observado também alteração nos níveis de expressão gênica dos receptores purinérgicos P2X e P2Y. A expressão dos receptores P2X4, P2X5, P2X7, P2Y1 e P2Y11 diminuiu, enquanto a expressão de P2Y6 aumentou com a hipóxia. A expressão aumentada de P2Y6 foi relacionado à redução da taxa de sobrevida de pacientes com CM. Esses níveis de expressão estão também aumentados em tumores de mama basais, e sua inibição por meio do composto químico 1,4-di-(feniltioureido) butano – MRS2578 –, um inibidor seletivo de receptores P2Y6, reduziu a migração de células do CM, podendo representar um novo alvo para terapias contra metástases nesse tipo de câncer (Mamedova *et al.*, 2004; Azimi *et al.*, 2016).

Além disso, análises de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em células MDA-MB-468, buscando a expressão dos receptores purinérgicos P2Y e P2X, mostraram que os receptores P2X5 estão enriquecidos no fenótipo mesenquimal do câncer e que sua inibição tem como consequência uma redução significativa (25%) na expressão da proteína vimentina induzida pelo fator de crescimento epitelial (EGF), indicando a associação do receptor P2X5 com o processo de metástase (Davis *et al.*, 2011).

Sinalização Purinérgica e outros potenciais terapêuticos

Já se sabe que a sinalização purinérgica é importante na modulação das respostas imunes, entretanto seu potencial terapêutico no microambiente tumoral ainda é pouco conhecido e descrito. O receptor P2Y6 está mutado e expresso em grande quantidade nos tecidos de CM e se relaciona com o prognóstico ruim

em pacientes, e o nível de expressão desse receptor está diretamente ligado com a malignidade, estágio e classificação do CM (Ma *et al.*, 2016).

Foram utilizadas análises de expressão gênica por RT-qPCR e de expressão protéica por Western Blotting em linhagens celulares de CM do tipo MDA-MB-231, Hs578t, BT-549 e MCF-7 para detectar os níveis de expressão do receptor P2Y6. A linhagem MDA-MB-231 foi tratada com UDP a fim de investigar a migração e invasão celular, mostrando efeito indutivo do UDP/P2Y6 na migração e invasão das células de câncer. Quando se inibiu a expressão dos receptores P2Y6 através do inibidor seletivo MRS2578, notou-se a diminuição da migração basal das células, migração induzida por UDP e, por consequência, também houve diminuição da invasão celular, confirmando papel importante desse receptor no processo de metástase (Ma *et al.*, 2016).

Esses resultados indicam um mecanismo autônomo de células de CM quando tratadas com drogas que evadem do tumor *in situ* através da estimulação extracelular de UDP e P2Y6, demonstrando que a sinalização purinérgica tem um alto potencial para ser usada como alvo de fármacos que atuam prevenindo metástases no CM (Ma *et al.*, 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O papel crítico do receptor P2Y2 foi demonstrando, podendo ser um alvo terapêutico em potencial no tratamento do CM. Por outro lado, a expressão de vários outros tipos de receptores P2Y e também de outros subtipos de receptores mediados por ATP não deve ser ignorada, uma vez que a associação deles é um caminho ainda a ser pesquisado (Qiu *et al.*, 2018). Apesar de já terem sido identificadas muitas vias de liberação de ATP em diferentes tipos celulares, o mecanismo dessa liberação ainda não foi completamente caracterizado. Ademais, é crescente no momento o consenso de que a ADO e o ATP são fundamentais no microambiente tumoral, afetando o crescimento do tumor, funções das células imunes e modulando de diferentes formas a interação entre o hospedeiro e o tumor. Por fim, espera-se que uma escolha minuciosa do receptor purinérgico, juntamente com moduladores de vias adenosinérgicas extracelulares, possa surgir

como novas terapias anticâncer, inibindo o crescimento tumoral e aumentando a resposta antitumoral do hospedeiro (Di Virgilio *et al.*, 2017).

Após a leitura, é importante notar que, por se tratar de um assunto relativamente novo, há necessidade de mais pesquisas na área, para melhor esclarecer o funcionamento do sistema purinérgico relacionado ao CM. Como potenciais terapêuticos a serem investigados com maior profundidade, estão a ativação dos receptores P2X7 e P2X11, inibindo a migração de células tumorais da mama, a baixa afinidade do P2X7 para ATP e a inibição da migração tumoral em altas concentrações de ATP, sendo essas altas concentrações também relacionadas à resposta inflamatória e morte celular. Ainda sobre o receptor P2X7, é necessário destacar sua associação ao crescimento tumoral e à metástase, tendo o ATP uma dupla função na célula, como imuno ativador e atuando na progressão tumoral. Ressalta-se também a ligação dos receptores P2X5, A3 e P2Y2 com metástase de CM. Esse último tem seu bloqueio relacionado à supressão do potencial invasivo e metastático das células cancerosas, podendo servir como alvo potencial para intervenções terapêuticas. Sendo assim, moduladores dos receptores purinérgicos já estão sendo estudados como possíveis medidas terapêuticas. Além dos receptores, o antiparasitário Ivermectina também está associado a uma atividade antitumoral, como modulador alostérico dos receptores purinérgicos.

REFERÊNCIAS

- AVANZATO, D. *et al.* Activation of P2X7 and P2Y11 purinergic receptors inhibits migration and normalizes tumor derived endothelial cells via cAMP signaling. *Scientific Reports*, v. 6, 32602: 2016.
- AZIMI, I.; BEILBY, H.; DAVIS, F. M.; MARCIAL, D. L.; KENNY, P. A.; THOMPSON, E. W.; ROBERTS-THOMPSON, E. W.; ROBERTS-THOMPSON, S. J.; MONTEITH, G. R. Altered purinergic receptor-Ca²⁺ signaling associated with hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Molecular Oncology*. v. 10, p. 166-178, 2016.
- BARROS, A. C. S. D. DE; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. *Revista Brasileira de Mastologia*, v. 25, n. 4, p. 146-155, 2015.
- BERGHUIS, A. M. S. *et al.* Detecting Blood-Based Biomarkers in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review of Their Current Status and Clinical Utility. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 2, 9 fev. 2017.
- BILIMORIA, M. M.; MORROW, M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 45, n. 5, p. 263-78, [s.d.].
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de informações sobre mortalidade. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 24 mar. 2017.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancer in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, nov. 2018.
- BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Disease*, v. 1, n. 1, jan. 2010.
- BUXTON, I. L. O.; YOKDANG N.; MATZ, R. M. Purinergic Mechanisms in Breast Cancer Support Intravasation, Extravasation and Angiogenesis. *Cancer Lett*, v. 291, n. 2, p. 131-41, 2010.
- DAVIS, F. M.; KENNY, P. A.; SOO, E. T-L.; VAN DENDEREN, B. J. W.; THOMPSON, E. W.; CABOT, P. J.; PARAT, M-O.; ROBERTS-THOMSON, S. J.; MONTEITH, G. R. Remodeling of Purinergic Receptor-Mediated Ca²⁺ Signaling as a Consequence of EGF-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, v. 6, n. 8, 2011.
- DIECI, M. V. *et al.* Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. *The Oncologist*, v. 19, p. 805-813, jun. 2014.
- DILLON, D.; GUIDI, A. J.; & SCHNITT, S. J. Pathology of invasive breast cancer. *Diseases of the breast*, n. 5, p. 381-410, 2014.
- DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*, v. 36, n. 3, p. 293-303, 2017.

DRAGANOV, D. *et al.* Modulation of P2X4/P2X7/ Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Scientific reports*, v. 5, 16222: 2015.

EUN, S. Y. *et al.* P2Y2 nucleotide receptor-mediated extracellular signal-regulated kinases and protein kinase C activation induces the invasion of highly metastatic breast cancer cells. *Oncology reports*, v. 34, p. 195-202, abr. 2015.

FARMER, P. *et al.* Identification of molecular apocrine breast tumors by microarray analysis. *Oncogene*, v. 24, p. 4660-4671, 2005.

GIULIANO, A. *et al.* Breast Cancer – Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *Cancer journal for Clinicians*, v. 64, n. 4, p. 290-303, mar. 2017.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* 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*, v. 24, p. 2206-2223, jul. 2013.

HARRELL, J. C. *et al.* Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 132, n. 2, p. 523-535, abr. 2012.

HU, Z. *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, v. 7, p. 96, 2006.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 2016.

Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>, 2017.

KARIHALOO, A. *et al.* Signals Which Build a Tubule. *Nephron Exp. Nephrol*, v. 100, p. 40-45, 2005.

KUMAR, V; ABBAS A. K.; FAUSTO N.; MITCHELL R. N. *Robbins Patologia Básica*. 8a edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LEDDEROSE, C. *et al.* Adenosine arrests breast cancer cell motility by A3 receptor stimulation. *Purinergic signalling*, v. 12, p. 673-685, ago. 2016.

LE DOUSSAL, V.; TUBIANA-HULIN, M.; FRIEDMAN, S.; HACENE, K.; SPYRATOS, F.; BRUNET, M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas, *Cancer*, v. 64, n. 9, p. 1914-1921, 1989.

MA, X.; PAN, X.; WEI, Y.; TAN, B.; YANG, L.; REN, H.; QIAN, M.; DU, B. Chemotherapy-induced uridine diphosphate release promotes breast cancer metastasis through P2Y6 activation. *Oncotarget*, n. 20, v. 7, 2016.

MAMEDOVA, L. K. *et al.* Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors. *Biochemical pharmacology*, v. 67, n. 9, p. 1763-1770, 2004.

MELICHAR, B. Biomarkers in the treatment of cancer: opportunities and pitfalls. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 51, n. 7, p. 1329-33, 1º jan. 2013.

NALEJSKA, E.; MAĆZYŃSKA, E.; LEWANDOWSKA, M. A. Prognostic and Predictive Biomarkers: Tools in Personalized Oncology. *Molecular Diagnosis & Therapy*, v. 18, n. 3, p. 273-284, 3 jun. 2014.

OLIVEIRA, A. L. M. B.; ROHAN, P. A.; GONÇALVES, T. R.; SOARES, P. P. S. Efeitos da Hipóxia na Variabilidade da Frequência Cardíaca em Indivíduos Saudáveis: Uma Revisão Sistemática. *International Journal of Cardiovascular Sciences*, v. 30, n. 3, p. 251-261, 2017.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, v. 5, n. 1, p. 5-23, fev. 2011.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Mammary development meets cancer genomics. *Nature Medicine*, v. 15, n. 8, p. 842-844, ago. 2009.

PRAT, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast*, v. 26, p. 26-35, 2015.

QIU, Y.; LIU, Y.; LI, W. H.; ZHANG, H. Q.; TIAN, X. X.; FANG, W. G. P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin. *Oncol reports*, v. 39, n 1, p. 138-150, 2018.

RIVENBARK, A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine.

American Journal of Pathology, v. 183, n. 4, p. 1113-1124, 2013.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 65, n. 1, p. 5-29, jan. 2015.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESENDALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 98, p. 10869-10874, 2001.

SØRLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J. S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C. M.; LØNNING, P. E.; BROWN, P. O.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 100, p. 8418-8423, 2003.

XIA, J. *et al.* P2X7 receptor stimulates breast cancer cell invasion and migration via the AKT pathway. *Oncology reports*, v. 34, p. 103-110, mar. 2015.

ZHANG, J. *et al.* ATP-P2Y2-b-catenin axis promotes cell invasion in breast cancer cells. *Cancer Science*, v. 108, n. 7, p. 1318-1327, jul. 2017.