

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MEIO CONDICIONADO DERIVADO DE
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO TRATADAS
COM ECDISTERONA SOBRE FIBROBLASTOS: UM FOCO NA
SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA**

GIZELE PIRES DE MOURA

PATOS DE MINAS – MG
SETEMBRO DE 2026

GIZELE PIRES DE MOURA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MEIO CONDICIONADO DERIVADO DE
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO TRATADAS
COM ECDISTERONA SOBRE FIBROBLASTOS: UM FOCO NA
SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia do
Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia.**

Área de concentração: Biociências.

Orientador (a): Profa. Dra. Thaise Gonçalves
de Araújo

PATOS DE MINAS – MG

SETEMBRO DE 2026

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M929
2026 Moura, Gizele Pires de, 1994-
 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MEIO CONDICIONADO DERIVADO
 DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO TRATADAS
 COM ECDISTERONA SOBRE FIBROBLASTOS: UM FOCO NA
 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA [recurso eletrônico] / Gizele Pires de
 Moura. - 2026.

 Orientador: Thaise Gonçalves de Araújo.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Pós-graduação em Biotecnologia.
 Modo de acesso: Internet.
 DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2026.727>
 Inclui bibliografia.

 1. Biotecnologia. I. Araújo, Thaise Gonçalves de ,1984-,
 (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação
 em Biotecnologia. III. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Rua Vereador Chico Filgueira, 33, Bloco Alfa, Sala 319 - Bairro Caiçaras, Patos de Minas-MG, CEP 38702-178

Telefone: (34) 3823-3714 - Ramal 226 - ppgbiotec@ibtec.ufu.br

**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	09/09/2026	Hora de início:	13:30 H	Hora de encerramento:	16:00
Matrícula do Discente:	42412BTC003				
Nome do Discente:	Gizele Pires de Moura				
Título do Trabalho:	Avaliação dos efeitos de meio condicionado derivado de células de câncer de mama triplo negativo tratadas com Ecdisterona sobre fibroblastos: um foco na sinalização purinérgica				
Área de concentração:	Biociências				
Linha de pesquisa:	Prospecção de produtos bioativos de interesse médico e industrial				

Reuniu-se, por webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, assim composta: Professores Doutores: Cristina Ribas Fürstenau (UFABC), Ademar Alves da Silva Filho (UFJF) e Thaise Gonçalves de Araújo (IBTEC - UFU), orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dra. Thaise Gonçalves de Araújo apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/09/2026, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Ribas Fürstenau, Usuário Externo**, em 09/09/2026, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ADEMAR ALVES DA SILVA FILHO, Usuário Externo**, em 09/09/2026, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **7669992** e o código CRC **49AA7E90**.

AUXÍLIO FINANCEIRO

FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais)

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos)

Dedico essa conquista ao meu marido, Hélio, por sempre apoiar meus sonhos, acreditar em mim e me incentivar a crescer e ir cada vez mais longe. Você   o alicerce, aquele que me sustenta, me fortalece e me lembra, nos momentos de d vida, que sou capaz de alcançar meus objetivos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pela força e por me permitir chegar até este momento. Sem Ele, eu nada seria. Obrigada por me guiar Pai, proteger e abençoar cada momento. Sei que sempre vai me levar para o melhor caminho. Continue a reger minha vida e meus planos, que tudo ocorra perante sua vontade.

Agradeço ao meu marido Hélio, pelo apoio incondicional durante toda esta caminhada, pela compreensão nos momentos ruins, por ser meu porto seguro perante todas as adversidades, por me dar força para seguir em frente. Por sempre me ouvir. Obrigada pelo incentivo constante, com certeza sem você ao meu lado esse mestrado não teria acontecido.

Agradeço as famílias, de sangue e coração, pelo apoio e compressão.

Agradeço a minha irmã Gláucia, que está presente em todos os momentos da minha história, sempre torceu por mim e desejou que eu tivesse tudo aquilo que almejava. A vida é sempre “corrida” e cheia de altos e baixos, mas você é minha constante e agradeço por ter você ao meu lado e por transformar essa jornada mais leve.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Thaise, pela confiança, orientação e pelos ensinamentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Você é uma pessoa maravilhosa, uma profissional incrível e tenho muito respeito, admiração e tenho você como modelo e inspiração. Sua contribuição foi fundamental para minha formação acadêmica e científica.

Aos professores, técnicos, pesquisadores e colaboradores que contribuíram para a realização dos experimentos e análises que compõem esta dissertação, agradeço pela disponibilidade, pelo conhecimento compartilhado e pela colaboração científica.

Aos colegas de laboratório, pela convivência, pelas discussões, pela ajuda nos experimentos. Especialmente, gostaria de agradecer a Gislaine, por me ensinar e ajudar desde o primeiro dia no laboratório até a finalização desse trabalho. Aos amigos que o laboratório me apresentou, Gabi, sempre presente, disposta a ouvir meus desabafos e oferecer apoio nos momentos em que mais precisei. Henrique, com sua disposição em ajudar e bom humor, sou muito grata. Helen, por disponibilizar seu escasso tempo me ajudando nos experimentos. A Fernanda, por mesmo de longe me orientar e auxiliar nos percalços dessa pesquisa. Paulinha, com seu jeito leve de ser. Ao Lucas, por todo auxílio. A toda a família Gbio, por tornarem mais leves os desafios encontrados durante essa trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade e pela estrutura disponibilizada para minha formação.

Agradeço a CAPES pela bolsa de fomento que proporcionou a realização deste trabalho. E a CNPQ, FAPEMIG e FINEP pelo financiamento.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo minha sincera gratidão.

RESUMO

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é o subtipo de CM mais agressivo que apresenta, em seu microambiente imunossupressor, um enriquecimento de fibroblastos que contribuem para a progressão e resistência das células tumorais. Os mecanismos envolvidos nessa interação permanecem pouco compreendidos, sobretudo quando compostos naturais são utilizados. No presente estudo, foram investigados os efeitos da Ecdisterona (20E) na modulação da migração de células de CMTN e como seu meio condicionado altera o comportamento de fibroblastos humanos, evidenciando o papel da sinalização purinérgica nesse contexto. Para isso, células MDA-MB231 (CMTN) e HFF-1 (fibroblastos) foram tratadas com 20E e ensaios de migração horizontal e vertical foram conduzidos com concentrações não citotóxicas. A 20E influenciou o comportamento migratório das células MDA-MB-231, especialmente o vertical, sugerindo seu potencial para conter a invasão dessas células. Além disso, seu meio condicionado inibiu a migração horizontal de fibroblastos, o que não aconteceu quando as células HFF foram tratadas diretamente com o composto. Análises computacionais demonstraram o potencial de 20E de interagir com CD73 e com os receptores de adenosina A2A e A2B. Para a CD73, a 20E apresentou energia de ligação superior ao ligante endógeno e igualando-se aos inibidores sintéticos. Em fibroblastos tratados com meio condicionado, os transcritos de *ADORA2B* (gene codificador para A2B) foram significativamente reduzidos enquanto os de *NT5E* (gene codificador para CD73) foram aumentados. Em conjunto, os resultados demonstram que a 20E, mesmo em concentrações não citotóxicas, altera o comportamento das células de CMTN e interfere na comunicação com células presentes em seu microambiente, sugerindo a participação da sinalização purinérgica e seu potencial na modulação da interação tumor-estroma.

Palavras-chave: Câncer de mama triplo-negativo. Microambiente tumoral. Nucleotídeos. Quimioterapia.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive BC subtype, that presents an enrichment of fibroblasts in its immunosuppressive microenvironment that contributes to tumor cell progression and resistance. The mechanisms involved in this interaction remain poorly understood, especially when natural compounds are used. In the present study, the effects of Ecdysterone on modulating TNBC cell migration and how its conditioned medium alters the behavior of human fibroblasts were investigated, highlighting the role of purinergic signaling in this context. To this end, MDA-MB231 (TNBC) and HFF-1 (fibroblasts) cells were treated with Ecdysterone (20E), and horizontal and vertical migration assays were conducted with non-cytotoxic concentrations. Interestingly, Ecdysterone influenced the migratory behavior of MDA-MB-231 cells, especially vertically, suggesting its potential to contain the invasion of these cells. Furthermore, its conditioned medium inhibited horizontal fibroblast migration, which did not occur when HFF cells were treated directly with the compound. Computational analyses demonstrated the potential of 20E to interact with CD73 and the A2A and A2B adenosine receptors. For CD73, 20E exhibited a higher binding affinity than the endogenous ligand and comparable affinity to synthetic inhibitors. In fibroblasts treated with conditioned medium, ADORA2B (gene encoding A2B) transcript levels were significantly reduced, whereas NT5E (gene encoding CD73) transcript levels were increased. Taken together, the results demonstrate that 20E, even at non-cytotoxic concentrations, alters the behavior of TNBC cells and interferes with their communication with cells within the tumor microenvironment, suggesting the involvement of purinergic signaling and its potential role in modulating tumor–stroma interactions.

Keywords: Triple-negative breast cancer. Tumor microenvironment. Nucleotides. Chemotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Significado
20E	Ecdisterona/20-hydroxyecdysone
A2AR	Receptor de A2A
A2BR	Receptor de A2B
ADA	Adenosina desaminase
ADK	Adenosina quinase
ADO	Adenosina
BL	Basal-like
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CM	Câncer de mama
CMTN	Câncer de mama triplo negativo
Cx	Conexinas
ER	Receptor de estrogênio
ER β	Receptor de estrogênio β
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HFF	Fibroblastos humanos
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IHC	Imuno-histoquímica
IL-10	Interleucina-10
IM	Imunomodulador
LAR	Luminal Androgen Receptor
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDSCs	Células mieloides supressoras
ME	Matriz extracelular
MES	Mesenquimal
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MT	Microambiente tumoral
NHG	Grau Histológico de Nottingham
NK	Células natural killer
NST	Carcinoma invasivo de tipo não especial
OMS	Organização Mundial da Saúde
Panx	Pannexinas
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PD-L1	Ligante do receptor PD-1
PKA	Proteína quinase canônica A
PN	Produtos naturais
PR	Receptor de progesterona
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TN	Triplo-negativo
TNC	Transportadores de nucleosídeos concentrativos
TNE	Transportadores de nucleosídeos equilibrativos
Treg	Células T reguladoras
VAB	Biópsia assistida a vácuo

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	13
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
1.1 Câncer de Mama.....	13
1.1.1 Definição e dados epidemiológicos.....	13
1.1.2 Diagnóstico.....	16
1.1.3 O Câncer de Mama Triplo-Negativo.....	18
1.2 O Microambiente tumoral e os fibroblastos associados ao tumor.....	20
1.3 Sinalização Purinérgica.....	24
1.3.1 Visão geral da sinalização purinérgica.....	24
1.3.2 Sinalização purinérgica no microambiente tumoral.....	27
1.3.3 Sinalização purinérgica no câncer de mama.....	28
1.4 Produtos naturais e sua capacidade de modelar o MT.....	30
REFERÊNCIAS.....	33
OBJETIVOS.....	40
Objetivo geral.....	40
Objetivos específicos.....	40
CAPÍTULO II.....	41
Ecdisterona interage computacionalmente com CD73 e o meio condicionado de células de câncer de mama triplo-negativo tratadas reduz a migração de fibroblastos normais.....	41
Resumo.....	42
Introdução.....	43
Material e métodos.....	44
Cultivo Celular.....	44
Viabilidade Celular.....	45
Obtenção do Meio Condicionado.....	45
Migração horizontal.....	45
Migração vertical.....	46
Análises <i>in silico</i>	46
RT-qPCR.....	48
Análises estatísticas.....	49
Resultados.....	49
Citotoxicidade da Ecdisterona.....	49
Efeito da Ecdisterona sobre a migração horizontal.....	50
Efeitos da Ecdisterona sobre a migração celular vertical de células de CMTN.....	51
Efeitos do meio condicionado sobre a migração de fibroblastos.....	52
Docking molecular da Ecdisterona com CD73, A2A e A2B.....	54
Efeitos da Ecdisterona sobre a expressão de componentes da sinalização purinérgica em fibroblastos tratados com meio condicionado.....	58
Discussão.....	59

Conclusão	61
Referências	62
<i>Graphical abstract</i>	69
CONCLUSÃO	70
APÊNDICE	71

CAPÍTULO I

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Câncer de Mama

1.1.1 Definição e dados epidemiológicos

O câncer de mama (CM), caracterizado por padrões epidemiológicos únicos e heterogeneidade significativa, continua sendo uma das principais causas de mortes relacionadas à malignidade em mulheres no mundo (XIONG *et al.*, 2025). Essa neoplasia abrange múltiplas entidades biológicas, marcadas por alterações genômicas, padrões distintos de expressão gênica e variações no microambiente tumoral, fatores que, em conjunto, modulam o comportamento clínico e a resposta terapêutica (NOLAN *et al.*, 2023).

A tumorigênese é um processo dinâmico e de múltiplas etapas caracterizado por vantagens adaptativas mediadas por alterações no material genético e expansão clonal (ZHANG *et al.*, 2024). No CM, por exemplo, mutações nos genes como *BRCA1* e *BRCA2*, fundamentais para a recombinação homóloga, comprometem a correção de quebras na dupla fita de DNA, promovendo o desenvolvimento das lesões malignas. Além disso, mutações em *TP53* prejudicam o controle do ciclo celular e a indução de apoptose, permitindo a sobrevivência de clones instáveis e geneticamente alterados. Esses eventos estabelecem uma base molecular crítica para a evolução da doença, associados à hiperativação da via PI3K/Akt e STAT3, o que assegura uma sinalização proliferativa contínua, resistência à morte celular e evasão à resposta imunológica. A esse cenário soma-se a angiogênese, frequentemente induzida pela secreção de VEGF em condições de hipóxia, garantindo o suprimento de oxigênio e nutrientes (MAQSOOD *et al.*, 2025; XIONG *et al.*, 2025).

Hanahan e colaboradores, reconhecendo o desafio do processo tumorigênico, destacaram oito características centrais que representam competências adquiridas ao longo da evolução tumoral e que sustentam o processo de malignidade, quais sejam: sustentação da sinalização proliferativa, inibição de supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, formação de novos vasos, ativação da invasão e metástase, reprogramação do metabolismo e escape imunológicos. Atualmente, são reconhecidas como o núcleo conceitual que explica tanto a biologia molecular quanto a clínica dos diversos cânceres,

incluindo o CM (HANAHAHAN, 2022). Mais recentemente, esse modelo foi refinado para enfatizar a integração sistêmica entre metabolismo, imunidade e microambiente tumoral, destacando a comunicação intercelular e a plasticidade tumoral como elementos centrais na regulação dinâmica desses aspectos (HANAHAHAN, 2025).

O CM é uma neoplasia maligna originada no epitélio das estruturas glandulares da mama. É caracterizado pela proliferação descontrolada e anormal de células epiteliais, que adquirem capacidade de invasão local e, potencialmente, de metástase para linfonodos regionais ou órgãos distantes, como ossos, pulmões e fígado. Trata-se de uma doença heterogênea do ponto de vista morfológico, imunohistoquímico e molecular, o que influencia fortemente seu comportamento biológico, resposta terapêutica e prognóstico (SMOLARZ *et al.*, 2022). É o tumor maligno mais comum entre mulheres no mundo, respondendo por cerca de 23,8% dos casos de câncer feminino em 2022. Apesar dos avanços em detecção, tratamento e prevenção, continua sendo uma das principais causas de morte em mulheres com idade entre 20 e 59 anos em diversos países, especialmente em regiões com menor acesso à assistência médica (KIM *et al.*, 2025). Em 2022, aproximadamente 2,3 milhões de novos casos foram registrados e 670 mil mortes no mundo (IARC, 2024). Sua incidência global mais que dobrou entre 1990 e 2021 e, até 2050, as mortes aumentarão de 38 a 68% (SHA *et al.*, 2024; KIM *et al.*, 2025).

Dados epidemiológicos também revelam que 70% dos casos de CM são diagnosticados em países com elevado índice de desenvolvimento humano (IDH) e nos estágios iniciais da doença. Contraditoriamente, em países com baixo IDH, quase 80% dos diagnósticos ocorrem com a doença já avançada, o que aumenta a taxa de mortalidade nesses locais (ALHARTHI *et al.*, 2023). No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o CM é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, com valores mais expressivos nas regiões Sul e Sudeste. Para cada ano do triênio 2026-2028 são estimados 78.610 casos novos, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 71,57 a cada 100 mil mulheres (Figura 1) (INCA, 2026).

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico do CM envolve uma abordagem integrada entre exame físico, exames de imagem e análises laboratoriais. O processo, geralmente, começa com o exame clínico das mamas, uma ferramenta de triagem importante, ainda que apresente baixa acurácia quando utilizada de forma isolada (MENES *et al.*, 2024). Por essa razão, é comumente associado à mamografia. Em casos específicos, especialmente em mulheres com mamas densas, a ultrassonografia e a ressonância magnética podem complementar a investigação. Quando há suspeita de malignidade, realiza-se uma biópsia para confirmar o diagnóstico, identificar características histológicas do tumor e definir o subtipo molecular (OBEAGU, OBEAGU, 2024).

A mamografia utiliza baixas doses de radiação para gerar imagens das mamas, sendo o principal exame de rastreamento do CM (OBEAGU; OBEAGU, 2024). Esse método permite a detecção precoce de alterações suspeitas, como microcalcificações e distorções arquiteturais, muitas vezes antes de se tornarem palpáveis no exame clínico. A evolução tecnológica trouxe a mamografia digital e a tomossíntese, que ampliaram a sensibilidade do exame, especialmente em mulheres com mamas densas (KASSIS *et al.*, 2024). A interpretação dos achados segue critérios padronizados pelo sistema BI-RADS, que orienta a conduta clínica (NICOSIA *et al.*, 2023).

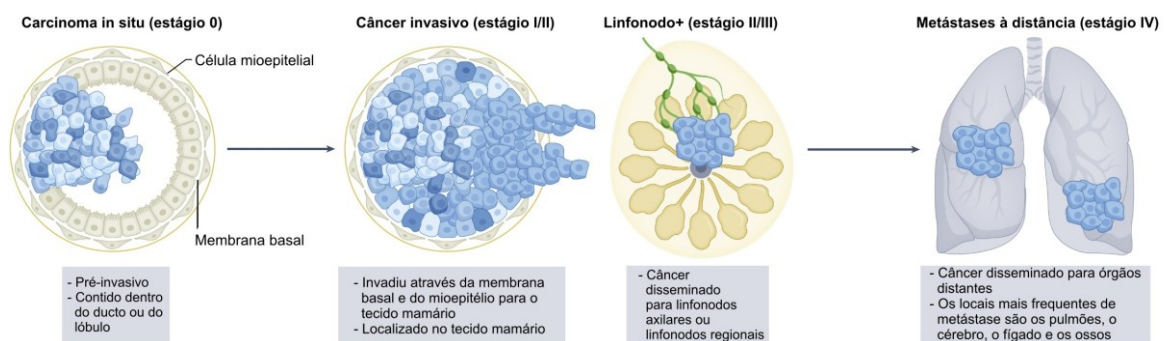
A biópsia, por sua vez, é considerada o padrão-ouro no diagnóstico definitivo do CM, sendo indicada para todas as lesões suspeitas detectadas por exame clínico ou por métodos de imagem. As técnicas mais utilizadas incluem a biópsia por agulha grossa (core biopsy) e a biópsia assistida a vácuo (VAB), ambas guiadas por ultrassonografia, mamografia ou ressonância magnética. A escolha da técnica depende da localização, tamanho da lesão e disponibilidade do serviço. A biópsia fornece material suficiente para a avaliação histopatológica detalhada e, principalmente, para a realização de testes imuno-histoquímicos, que são essenciais para as classificações do tumor (LOIBL *et al.*, 2024).

Histologicamente, o CM é classificado em diferentes subtipos conforme os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). O carcinoma ductal invasivo, mais especificamente o carcinoma invasivo de tipo não especial (NST), é o mais prevalente, correspondendo a cerca de 70–80% dos casos. O carcinoma lobular invasivo, por sua vez, revela um padrão de infiltração mais difuso e traz desafios adicionais para a detecção por imagem. Subtipos menos comuns incluem o carcinoma tubular, o mucinoso, o medular e o papilífero, cada um com relevância

clínica própria. Essa classificação histológica fornece a base para o diagnóstico e a estratificação prognóstica dos pacientes (CONTI *et al.*, 2024).

A análise da peça também determina a progressão, o tamanho e a capacidade de disseminação das células transformadas, definindo seu estadiamento. Os estágios do CM variam de 0 a IV (Figura 2). O estágio 0 corresponde ao carcinoma *in situ*, em que as células permanecem restritas aos ductos sem invadir os tecidos vizinhos. O estágio I abrange tumores de até 2 cm, sem comprometimento linfonodal, enquanto no estágio II o tumor pode alcançar até 5 cm e apresentar envolvimento de linfonodos axilares próximos. O estágio III é caracterizado por doença localmente avançada, com tumores maiores e/ou múltiplos linfonodos comprometidos, podendo inclusive afetar pele ou parede torácica adjacente. O estágio IV, por sua vez, corresponde à doença metastática, quando há disseminação para órgãos distantes, como ossos, fígado, pulmões ou cérebro (ALHARTHI *et al.*, 2023).

Figura 2. Estadiamento do câncer de mama. O estadiamento é baseado no tamanho da lesão e sua disseminação para outros tecidos, sendo essencial para o prognóstico dos pacientes.



Adaptado de Harris, Michael A., *et al.* 2024.

Histologicamente, outras três características morfológicas também são analisadas e determinam o Grau Histológico de Nottingham (NHG): a formação tubular (diferenciação glandular), o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica, de modo que cada componente recebe uma pontuação de I a III. Tumores de grau 1 apresentam maior diferenciação e, em geral, estão associados a evolução clínica mais favorável; aqueles de grau 3, por outro lado, são pouco diferenciados, exibem comportamento mais agressivo e demandam abordagens terapêuticas mais agressivas. O grau 2 ocupa uma posição intermediária e, muitas vezes, requer integração com outros marcadores para definição de conduta. Estudos recentes confirmam que, mesmo em um cenário de avanços em biologia molecular e caracterização genética, a avaliação histológica tradicional mantém sua relevância prática no delineamento do prognóstico e das estratégias terapêuticas (SHARMA *et al.*, 2024).

Por fim, a imuno-histoquímica (IHC) é empregada para identificar a expressão de biomarcadores. Estudos recentes vêm utilizando abordagens de aprendizado de máquina e inteligência artificial para melhorar a interpretação das lâminas de IHC, reduzindo variações inter-observadores e aumentando a precisão na quantificação de receptor de estrógeno (ER – do inglês *Estrogen Receptor*), receptor de progesterona (PR - do inglês *Progesterone Receptor*), receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2 PR - do inglês *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) e do marcador de proliferação Ki-67 (MACAULAY *et al.*, 2025).

Na prática clínica, são considerados quatro subtipos moleculares principais: Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido e Triplo-negativo (TN). O subtipo luminal A é definido por tumores positivos para receptores hormonais (ER e PR), negativos para HER2 e com baixa expressão de Ki-67, o que indica crescimento mais lento, melhor resposta à terapia endócrina e prognóstico favorável, com taxas de sobrevida global em torno de 95% aos cinco anos em estádios iniciais. Já o luminal B também é positivo para os receptores hormonais, porém apresenta maior expressão de Ki-67 e pode ser HER2-positivo ou não. Essas características refletem maior agressividade e necessidade de tratamento combinado com quimioterapia, resultando em taxas de sobrevida ligeiramente menores, próximas a 91% em cinco anos. Os tumores HER2-enriquecidos, por sua vez, exibem amplificação desse marcador sem a expressão de ER e PR. Em geral, apresentam comportamento mais agressivo, mas que, atualmente, se beneficiam de terapias-alvo anti-HER2, como o trastuzumabe, o que tem melhorado substancialmente o prognóstico. Já os tumores classificados como TN não expressam ER, PR e HER2. São caracterizados por alta instabilidade genômica e pior prognóstico, com maior risco de recorrência precoce, metástases à distância e sobrevida global inferior quando comparados aos demais subtipos (LI *et al.*, 2020; ZHANG, 2023; XIONG *et al.*, 2025).

1.1.3 O Câncer de Mama Triplo-Negativo

O câncer de mama triplo negativo é altamente heterogêneo e biologicamente complexo. Caracteriza-se por comportamento clínico agressivo, maior taxa de proliferação tumoral, propensão a metástases precoces e pior prognóstico em comparação a outros subtipos (LIU *et al.*, 2016). Representa aproximadamente 15-20% de todos os casos da doença e evidências da literatura indicam que é o subtipo associado à maior mortalidade (PERES *et al.*, 2023). O CMTN é comumente diagnosticado na pré-menopausa, em pacientes com idade inferior a 40 anos e prevalente naquelas com mutações em *BRCA1/2*. As taxas de incidência ajustadas por

idade são mais altas em mulheres negras do que em mulheres brancas não hispânicas (CHEHAYEB *et al.*, 2025).

A ausência de alvos terapêuticos nesse subtipo tem evidenciado a necessidade de se compreender sua diversidade molecular (LIU *et al.*, 2016). Revisões recentes destacam que análises transcriptômicas permitiram identificar diferentes subtipos moleculares do CMTN, cada um com assinaturas gênicas, características biológicas e potenciais vulnerabilidades terapêuticas distintas (DERAKHSHAN; REIS-FILHO, 2022). O subtipo *Luminal Androgen Receptor* (LAR) corresponde a cerca de 23% dos casos de CMTN e se destaca pela menor complexidade genômica e pela presença de mutações em genes como *PIK3CA*, *AKT1*, *NF1*, *GATA3* e *CDH1*. O subtipo Imunomodulador (IM) representa aproximadamente 24% dos tumores TNs, caracterizado pela expressão robusta de genes ligados à resposta imune e à sinalização de pontos de controle. Já o *Basal-like* (BL), que corresponde a cerca de 39% dos casos, apresenta um perfil de alta instabilidade genômica, com mutações frequentes em *TP53* e sinais de deficiência no reparo homólogo do DNA. Por fim, o subtipo Mesenquimal (MES), encontrado em cerca de 15% das pacientes com CMTN, é marcado por um padrão associado à transição epitélio-mesenquimal (TEM), elevada expressão de marcadores de células-tronco tumorais e ativação das vias PI3K/Akt/mTOR. Assim, são mais invasivos e menos responsivos às terapias tradicionais (LIU *et al.*, 2024; XIANG; YUE, 2025).

Historicamente, a quimioterapia tem sido o pilar do tratamento do CMTN (DOGRA *et al.*, 2025). Contudo, o chamado “paradoxo triplo-negativo” ainda assombra pacientes, médicos e pesquisadores, uma vez que a recidiva é precoce e as células se tornam resistente às drogas (OBIDIRO *et al.*, 2023). Antraciclina (como doxorrubicina ou epirubicina) e os taxanos (como paclitaxel ou docetaxel) permanecem como base na conduta inicial do CMTN devido à sua eficácia comprovada em eliminar células tumorais proliferativas. Imunoterápicos também vem sendo adotados, em especial os inibidores de PD-1, (proteína de morte celular programada 1), um receptor que regula negativamente a ativação das células T. Esse tratamento é elegível para pacientes com tumores PD-L1 (ligante do receptor PD-1) – positivos e se baseia no bloqueio dessa interação PD-1/PD-L1, restaurando a capacidade do sistema imune de reconhecer e destruir as células cancerígenas (ALONSO-RON *et al.*, 2025; DOGRA *et al.*, 2025). Já os pacientes com mutações germinativas em *BRCA1/2* podem se beneficiar do uso de inibidores de PARP (poli(ADP-ribose) polimerase), uma classe de fármacos que atua bloqueando a principal via de reparo de quebras simples no DNA. Em células tumorais com deficiência no reparo por recombinação homóloga — como ocorre nas mutações em *BRCA* —, essa inibição leva ao acúmulo irreparável de danos genômicos, resultando em morte celular

seletiva por colapso replicativo. Essa abordagem, tem mostrado eficácia clínica significativa em CMTN com mutação em *BRCA* (SCHETTINI *et al.*, 2024).

No contexto dos subtipos do CMTN, sabe-se que o IM é o que melhor responde à imunoterapia com bloqueadores de checkpoints. Já o BL depende fortemente da quimioterapia, embora pacientes com mutações em *BRCAl/2* se beneficiem do uso de inibidores de PARP. Para o subtipo MES, terapias-alvo ainda se encontram em fase experimental. Por fim, o subtipo LAR abre espaço para ensaios clínicos com antiandrogênicos e inibidores de PI3K/AKT, ainda não aplicados rotineiramente (DOGRA *et al.*, 2025; ALONSO-RON *et al.*, 2025). Contudo, a estratificação molecular ainda não orienta diretamente a prática clínica (DOGRA *et al.*, 2025). Portanto, o tratamento do CMTN permanece desafiador. Sua heterogeneidade não está associada apenas às suas características moleculares intrínsecas, mas também às interações estabelecidas com o microambiente tumoral (MT), o qual se estabelece majoritariamente imunossupressor (SABIT *et al.*, 2025).

1.2 O Microambiente tumoral e os fibroblastos associados ao tumor

As células não existem isoladamente no organismo, mas interagem constantemente com nutrientes, oxigênio, matriz extracelular (ME) e células vizinhas, o que define seu microambiente, o qual regula processos fisiológicos importantes como proliferação, diferenciação e morte celular (PENG *et al.*, 2025). Quando ocorre a transformação maligna, o MT não apenas fornece suporte físico e metabólico às células cancerígenas, mas atua como um agente importante na progressão da doença, contando com a presença de fibroblastos ativados, células imunes moduladas, um remodelamento da ME e alterações nos gradientes de oxigênio (LARSON *et al.*, 2025). Assim, o MT engloba células tumorais, ME, células imunes, células endoteliais, uma complexa rede de moléculas sinalizadoras e células estromais (GUO *et al.*, 2024). Esses constituintes promovem, coletivamente, interações dinâmicas que sustentam o crescimento do tumor, metástase e respostas diferenciadas às terapias (LI *et al.*, 2025).

A ME é composta por macromoléculas como colágenos, lamininas, proteoglicanos e glicoproteínas. Sofre remodelamento contínuo, sendo um importante fator estrutural e regulador da comunicação celular (LEE *et al.*, 2025). No contexto tumoral, esse remodelamento é intensificado: há deposição excessiva de colágeno, reticulação e alteração da disposição tridimensional resultando em alterações na rigidez do tecido e ativação de diferentes vias de sinalização. Além disso, fragmentos gerados pela degradação da ME liberam fatores bioativos que influenciam a angiogênese, quimiotaxia e recrutamento de células estromais, contribuindo

para a plasticidade do MT (YUAN *et al.*, 2023).

As células imunes incluem populações tanto da imunidade adaptativa quanto da inata, como linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺, Tregs), células NK (do inglês *natural killer*), macrófagos associados ao tumor (TAMs - do inglês *Tumor-Associated Macrophages*), células mieloides supressoras (MDSCs - do inglês *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) e células dendríticas. Essas células participam da vigilância antitumoral, apresentação de antígenos e regulação de respostas inflamatórias. Contudo, também podem ser moduladas no MT (LI *et al.*, 2024).

Os linfócitos T CD8⁺ atuam como efetores centrais da imunidade antitumoral, reconhecendo antígenos tumorais e promovendo a morte das células cancerígenas por meio da liberação de granzimas e perforinas. Além da citotoxicidade direta, essas células secretam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , que amplificam a resposta imune e modulam o MT. Contudo, em muitos tumores, incluindo o CM, os linfócitos T CD8⁺ tornam-se funcionalmente exauridos devido à estimulação antigênica crônica e à presença de sinais imunossupressores, como o aumento de PD-1, TIM-3 e LAG-3 em sua superfície. Esse estado promove a persistência e progressão do câncer (NAIR *et al.*, 2025).

As células T reguladoras (Treg) são amplamente distribuídas por todo o corpo e, em condições fisiológicas, ajudam a manter a tolerância e prevenir reações imunológicas exacerbadas, protegendo contra doenças autoimunes. No contexto tumoral, entretanto, assumem papel imunossupressor. No MT, as Tregs inibem a ação de células T efectoras, bem como modulam negativamente a atividade de células dendríticas e macrófagos, fortalecendo o escape imunológico. Por essa razão, estratégias que visem eliminar ou inibir as Tregs intratumorais têm sido exploradas como complemento para aumentar a eficácia da imunoterapia antitumoral (QIN *et al.*, 2024).

As células NK, normalmente, atacam diretamente as células tumorais e secretam IFN- γ para inibir a disseminação e metástase (GUO *et al.*, 2024). Contudo, no microambiente tumoral, essas células sofrem rápida perda de suas funções efectoras, adquirindo um estado disfuncional que favorece a evasão imunológica (DEAN *et al.*, 2024). Já os TAMs são células derivadas de monócitos ou macrófagos residentes que, sob o estímulo do MT, adquirem uma polarização pró-tumoral. Apresentam papel central na progressão do câncer e na resistência ao tratamento, sendo reconhecidos como alvos promissores na imunoterapia. TAMs exibem plasticidade funcional, podendo adotar um fenótipo M1, com ação antitumoral, ou M2, de perfil pró-tumoral, que favorece angiogênese, metástase e imunossupressão ao secretarem VEGF, TGF- β e expressarem PD-L1 (XIA *et al.*, 2025). No CMTN, o MT é caracterizado por alta infiltração de TAMs com perfil imunossupressor, determinando um pior prognóstico e menor sobrevida

dos pacientes (STAVROU *et al.*, 2024; GUO *et al.*, 2024).

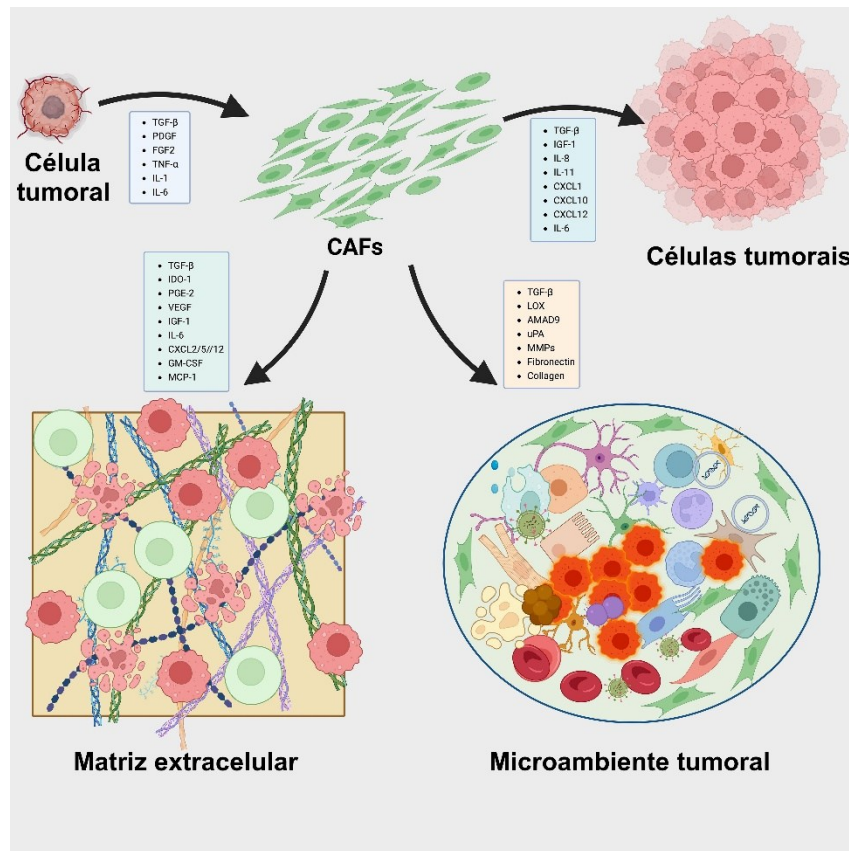
As MDSCs, por sua vez, formam um grupo heterogêneo de células da linhagem mieloide que tendem a acumular-se no MT e exercem forte ação reguladora sobre a resposta imune. Elas inibem a ativação de linfócitos T e células NK por meio da secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10, TGF- β , além da produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (LI *et al.*, 2021; YASEEN *et al.*, 2020). Estudos em pacientes com CM mostram que níveis elevados de MDSCs, tanto circulantes quanto infiltrantes, se associam a estágios mais avançados, maior risco de metástase e menor sobrevida global (LIU *et al.*, 2023).

As células endoteliais normais formam uma vasculatura estruturada para garantir a oxigenação adequada e o fornecimento de nutrientes aos tecidos. No MT, sofrem angiogênese anormal por meio da sinalização induzida por hipóxia e secreção de VEGF, levando a vasos sanguíneos disfuncionais e hipóxicos, os quais promovem a invasão e a metástase, limitando a eficácia terapêutica (LUGANO *et al.*, 2020; MATUSZEWSKA *et al.*, 2021). Além disso, as células endoteliais associadas ao tumor exibem alta plasticidade, promovendo TEM. Em paralelo, sofrem reprogramação metabólica, caracterizada pelo aumento da dependência da glicólise em condições de hipóxia (KANE *et al.*, 2025).

Moléculas sinalizadoras – entre elas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento – constituem um componente abundante e decisivo do MT. As citocinas atuam como mediadores da comunicação celular, modulando a resposta imune. Quimiocinas direcionam o recrutamento de células do sistema imune, incluindo linfócitos e macrófagos, que podem ser reprogramados para funções pró-tumorais. Já os fatores de crescimento, como VEGF, TGF- β e EGF, estimulam a proliferação celular, angiogênese e remodelamento tecidual, além de facilitar processos como invasão e metástase (LEE *et al.*, 2025; FAN; HE, 2022).

Por fim, os fibroblastos associados ao câncer (CAFs - do inglês *Cancer-Associated Fibroblasts*) são células estromais ativadas que, no MT, adquirem um fenótipo distinto dos fibroblastos normais. Eles passam a secretar fatores de crescimento, citocinas e remodeladores da ME, criando condições que sustentam a proliferação tumoral, a angiogênese e a evasão imune (Figura 3) (XU *et al.*, 2025). Segundo estudo recente, a interação entre células tumorais e CAFs reduz a eficácia de terapias-alvo em modelos de CMTN, sugerindo a importância dessa interação na predição da resposta terapêutica (USCANGA-PERALES *et al.*, 2016; PERES *et al.*, 2023).

Figura 3. Interações dinâmicas envolvendo os fibroblastos associados ao tumor. Diferentes moléculas sinalizadoras são liberadas tanto pelas células malignas quanto pelos CAFs, alterando a matriz extracelular e modelando o microambiente tumoral.



Fonte: adaptado de Liu *et al.* (2025).

TGF-β (fator de crescimento transformador beta); PDGF(fator de crescimento derivado de plaquetas); FGF2(fator de crescimento de fibroblastos 2); TNF-α (fator de necrose tumoral alfa); IL-1(interleucina 1); IL-6(interleucina 6); IDO-1(indoleamina 2,3-dioxigenase 1); PGE-2(prostaglandina E2); VEGF(fator de crescimento endotelial vascular); IGF-1(fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1); CXCL2/5//12(quimiocinas C-X-C ligante 2, 5 e 12); GM-CSF(fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos); MCP-1(proteína quimioatraente de monócitos 1); IL-8(interleucina 8); IL-11(interleucina 11); CXCL1(quimiocina C-X-C ligante 1); CXCL10(quimiocina C-X-C ligante 10); CXCL-12(quimiocina C-X-C ligante 12); LOX(lisil oxidase); AMAD9(metaloproteinase desintegrina 9); uPA(ativador do plasminogênio tipo uroquinase); MMPs(metaloproteinases da matriz); Fibronectin(fibronectina); Collagen(colágeno).

No CM, os CAFs não formam uma população homogênea, mas podem ser subdivididos em quatro subconjuntos principais (CAF-S1 a CAF-S4), cada um com funções específicas no MT. Estudos mostram que tumores enriquecidos em CAF-S4 apresentam maior infiltração de linfócitos T CD8⁺ e menor número de células T regs, sugerindo um ambiente imunológico relativamente mais favorável. Em contraste, uma alta densidade de CAF-S1 está associada ao aumento de células CD45⁺ e de TAM's, mas com redução de linfócitos T CD8⁺. Essa correlação negativa com células T CD8⁺ é particularmente marcante no CMTN, possivelmente em razão da maior secreção de citocinas imunossupressoras, como a interleucina-10 (IL-10). Além disso, CAF-S1 contribui para a sobrevivência e diferenciação de Tregs e potencializa sua

ação inibitória sobre células T efectoras, especialmente por meio da maior expressão de B7-H3 (CD276), CD73 e dipeptidil peptidase 4 (DPP4), em comparação com o CAF-S4. Embora o CMTN apresente enriquecimento tanto em CAF-S1 quanto em CAF-S4, até o momento não há evidências consistentes de que essa diferença se traduza em impacto direto na sobrevida das pacientes (HARRIS *et al.*, 2024).

CAFs também apresentam um metabolismo alterado, com produção intensa de lactato e piruvato (BECKER *et al.*, 2020). Essa ativação glicolítica dos CAFs é impulsionada por uma reprogramação epigenética mediada pelo HIF-1 α e por enzimas glicolíticas, induzida pela hipóxia (KOZLOV *et al.*, 2020). A elevação dessa atividade nas CAFs pode estar associada à maior expressão de transportadores como MCT4, que favorece a liberação de lactato e contribui para a reprogramação metabólica do MT (AFFINITO *et al.*, 2024). Além das alterações metabólicas, o MT também apresenta intensa sinalização purinérgica, com acúmulo de ADO em condições de estresse e hipóxia. A ADO, por sua vez, pode exercer efeito imunossupressor ao reduzir a atividade de linfócitos T citotóxicos e células NK, comprometendo a resposta imune antitumoral e evidenciando a relevância da sinalização purinérgica na progressão do câncer (REMLEY *et al.*, 2023).

1.3 Sinalização Purinérgica

1.3.1 Visão geral da sinalização purinérgica

A sinalização purinérgica refere-se a um sistema de comunicação celular mediado por nucleotídeos extracelulares, como ADP, AMP, UTP, UDP e ATP principalmente, e nucleosídeos, como a ADO, incluindo mecanismos de liberação dessas moléculas, seus receptores específicos, enzimas extracelulares responsáveis por sua degradação ou regeneração, além das vias de recaptação (DI VIRGILIO *et al.*, 2024). Os primeiros estudos que deram origem ao conceito de sinalização purinérgica foram realizados na década de 1970 por Geoffrey Burnstock, que propôs que nucleotídeos como o ATP funcionavam como neurotransmissores não adrenérgicos e não colinérgicos, uma ideia inovadora e inicialmente controversa. Posteriormente, a clonagem e caracterização dos receptores purinérgicos, expandiram a compreensão sobre o papel dessa via em diversos tecidos e sistemas. De fato, é uma área em expansão, envolvendo, inclusive, o desenvolvimento de fármacos que modulam esses receptores (HAN *et al.*, 2022).

De modo geral o ATP fornece energia em diferentes processos celulares sendo

conhecido como a principal fonte de energia das células. Nos anos 80, o ATP foi proposto como uma molécula de sinalização nos sistemas nervosos periférico e central. Desde então, o ATP tem se mostrado uma molécula crítica de transdução de sinal extracelular que regula numerosas vias incluindo neurotransmissão e secreção hormonal, bem como regulação de órgãos sólidos, plaquetas e função imunológica (VOLONTE *et al.*, 2024).

O ATP intracelular pode ser liberado para o espaço extracelular em resposta a estímulos fisiopatológicos, incluindo estresse oxidativo, estresse de cisalhamento, radiação ionizante, estiramento mecânico e hipóxia. Essa liberação ocorre por múltiplos mecanismos moleculares, sendo que, entre os mais relevantes, destacam-se os hemicanais formados por conexinas (Cx) e os canais formados por pannexinas (Panx). Esses canais permitem o transporte controlado de ATP através da membrana plasmática, frequentemente em associação com a ativação de diferentes subtipos de receptores purinérgicos, modulando respostas celulares como inflamação, morte celular programada e comunicação intercelular (VOLONTE *et al.*, 2024).

A ADO é um ribonucleosídeo formado pela ligação entre adenina e ribose, descrito pela primeira vez em 1929. Cassavaugh *et al.* (2025) evidenciou que a concentração extracelular dessa molécula é dinamicamente regulada pelo equilíbrio entre os níveis de ATP e ADO, o qual varia de acordo com o tipo celular e com a atividade das enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação. Sua produção pode ocorrer por vias intracelulares — como a desfosforilação de nucleotídeos — ou por vias extracelulares, principalmente através da ação sequencial de ectonucleotidases que convertem ATP liberado no meio em adenosina bioativa.

A regulação intracelular da ADO ocorre por meio de mecanismos que controlam tanto sua entrada quanto sua saída da célula, processo denominado transporte bidirecional. Esse transporte é realizado principalmente por dois grupos de proteínas: os transportadores de nucleosídeos concentrativos (TNC), que utilizam energia para mover a ADO contra seu gradiente de concentração, e os transportadores de nucleosídeos equilibrativos (TNE), que permitem sua passagem de acordo com o gradiente, sem gasto energético. Além do transporte, a concentração intracelular de ADO é modulada por processos enzimáticos, como a desaminação, catalisada pela adenosina desaminase (ADA), que converte adenosina em inosina, e a refosforilação, promovida pela adenosina quinase (ADK - do inglês *Adenosine Kinase*), que reconverte a adenosina em ATP. A distribuição e a atividade desses transportadores e enzimas variam de acordo com o tipo de tecido, sendo os TNE mais expressos na vasculatura e os TNC predominantes em epitélios especializados (CASSAVAUGH *et al.*, 2025).

Dessa forma, o ATP e ADO são responsáveis pela regulação de múltiplas funções

intracelulares, incluindo a liberação de moléculas de sinalização (neurotransmissores, quimiocinas etc.), contração do músculo liso e funções metabólicas. Essas moléculas se ligam a receptores específicos na superfície celular denominados receptores purinérgicos, que se dividem em duas famílias principais: os receptores P2, ativados por ATP, ADP, UTP e ADP, e os receptores P1, ativados pela ADO. A ativação desses receptores modula a resposta celular (ALLARD *et al.*, 2020; LAN *et al.*, 2018).

O ATP extracelular e os outros nucleotídeos atuam como ligantes para duas principais subfamílias de receptores purinérgicos: os receptores ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y. Os receptores P2X são canais iônicos ativados por ligantes, compostos por sete subtipos (P2X1 a P2X7), enquanto os receptores P2Y são acoplados à proteína G e divididos em oito subtipos (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), diferenciando-se pela seletividade de agonistas e pelas vias de sinalização intracelular que ativam. A estimulação dessas duas classes de receptores está associada a efeitos predominantemente pró-inflamatórios e pró-trombóticos (YEGUTKIN; BOISON, 2022).

Já a ADO exerce suas ações por meio de receptores denominados P1, que pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR - do inglês *G Protein-Coupled Receptor*) classe A (semelhante à rodopsina). A família de receptores P1 tem quatro membros A1, A2A, A2B e A3 (CAMPOS-CONTRERAS *et al.*, 2022). Os receptores A1 e A3 são preferencialmente acoplados às proteínas Gi/o, inibindo a produção de adenilato ciclase e AMP cíclico. Por outro lado, os receptores A2A e A2B são geralmente receptores acoplados a Gs que desencadeiam o acúmulo intracelular de cAMP. O acúmulo de cAMP pode ativar tanto a proteína quinase canônica A (PKA - do inglês *Protein Kinase A*) quanto as vias EPAC não canônicas. Em contraste com os receptores A2A, os receptores A2B (A2BR) também podem se acoplar às proteínas G e desencadear a via da fosfolipase C. Todos os quatro receptores de adenosina demonstraram ainda induzir as vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK - do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*) e JNK (ALLARD *et al.*, 2017).

A ação desses efetores purinérgicos é regulada por meio da ação de enzimas que realizam a hidrólise dos nucleotídeos em seus respectivos nucleosídeos e que são denominadas ectonucleotidasas. As principais envolvidas no câncer segundo Gardani *et al.* (2024) são: (i) Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases –EC 3.6.1.5, como a CD39) e (ii) Ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (NPPs – EC 3.6.1.9/EC 3.1.4.1) que atuam no catabolismo extracelular de dinucleotídeos; (iii) Fosfatase alcalina (AP – EC 3.1.3.1) que hidrolisa nucleotídeos monofosfato; e (iv) Ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'NT/CD73 - Ec 3.1.3.5). No escopo desse trabalho, destacam-se as ectoenzimas CD39 e CD73.

A CD39, também conhecida como ENTPD1 ou NTPDase1, é uma ectoenzima da família das NTPDases, que inclui os isoformas 1, 2, 3 e 8. Localizada na superfície da membrana plasmática, a CD39 desempenha papel central na sinalização purinérgica ao hidrolisar ATP e ADP extracelulares em AMP, etapa essencial para a regulação da concentração de nucleotídeos no microambiente extracelular. Em seguida, o AMP é rapidamente convertido em ADO pela ação da CD73, uma enzima ancorada à membrana celular expressa em diversos tecidos e tipos celulares, incluindo linfócitos B, alguns subtipos de linfócitos T, células endoteliais, epiteliais e, com destaque, células tumorais. A velocidade da reação catalisada pela CD73 torna a atividade da CD39 o principal ponto de controle dessa cascata enzimática sendo sua regulação essencial para a manutenção da homeostase em diversos tecidos (CASSAVAUGH *et al.*, 2025). Assim, essa atividade coordenada não apenas regula a disponibilidade de nucleotídeos extracelulares, mas também estabelece a base para os efeitos da sinalização purinérgica no microambiente tumoral.

1.3.2 Sinalização purinérgica no microambiente tumoral

À medida que as lesões pré-cancerosas evoluem para tumores localizados e, posteriormente, para formas metastáticas, as células tumorais ajustam continuamente seu metabolismo em resposta às condições do MT e aos estados funcionais internos. Essas mudanças refletem a influência combinada de sinais endógenos das próprias células malignas e de estímulos provenientes do microambiente, que juntos modulam o equilíbrio entre sobrevivência, proliferação e invasividade (FAUBERT *et al.*, 2020). Nesse contexto, a sinalização purinérgica desempenha papel crucial na regulação do MT o qual apresenta uma regulação positiva de CD39 e / ou CD73 como resultado de hipóxia tecidual, inflamação, estresse oxidativo e TEM (YEGUTKIN; BOISON, 2022). De fato, a sinalização purinérgica modula processos como migração celular, morte imunogênica e evasão terapêutica, configurando-se como reguladora chave do crescimento tumoral. Além disso, contribui diretamente à resistência a tratamentos quimioterápicos, radioterapias e imunoterapias (YEGUTKIN; BOISON, 2022; ALLARD *et al.*, 2020).

O ATP associado ao tumor, derivado de células necróticas e inflamatórias e liberado diretamente pelas células cancerígenas, atua sobre receptores purinérgicos desencadeando sinais de cálcio intracelular que modulam a migração celular (DI VIRGILIO *et al.*, 2018; SCARPELLINO *et al.*, 2019). Além de estimular a migração, a sinalização purinérgica tem papel direto na invasão tumoral, etapa essencial para o estabelecimento de metástases. A ADO,

por sua vez, atua como um mediador na interação com as células de defesa, conduzindo à evasão imunológica (ALLARD *et al.*, 2017).

O acúmulo de ADO no microambiente tumoral promove alterações no estroma e estimulando a secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs). Essas enzimas degradam a matriz extracelular, facilitando a penetração das células tumorais em tecidos adjacentes e o avanço para órgãos distantes. Além disso, a sinalização purinérgica intensifica a comunicação entre células tumorais e células do estroma, resultando em um ambiente propício à disseminação. A inibição da produção de ADO tem se mostrado capaz de reduzir de forma consistente a capacidade invasiva das células tumorais, ressaltando a importância dessa via na remodelação do MT (ALLARD *et al.*, 2020).

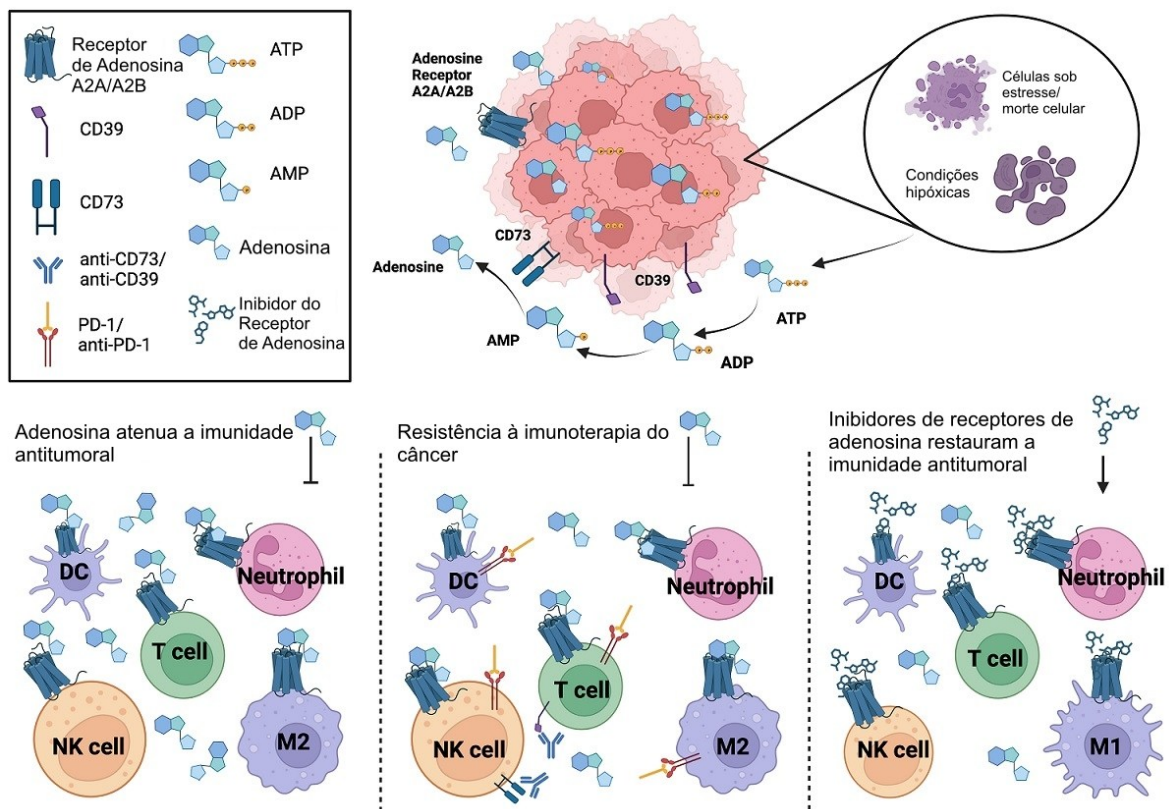
Nesse cenário, os CAFs têm um importante papel na sinalização purinérgica que ocorre no MT. Essas células expressam altos níveis de CD73, contribuindo para a geração de ADO, que por sua vez reforça a imunossupressão local e promove a progressão tumoral. Além da produção direta de ADO, os CAF's secretam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento que remodelam a ME, ampliando a capacidade invasiva e metastática das células transformadas. Assim, a interação entre CAFs e a via purinérgica cria um circuito de retroalimentação que sustenta a agressividade tumoral, destacando esses fibroblastos como alvos potenciais em estratégias terapêuticas combinatórias (ZHANG *et al.*, 2023). Esses mecanismos interligados reforçam a importância da sinalização purinérgica como um eixo regulador da intercomunicação celular no MT.

1.3.3 Sinalização purinérgica no câncer de mama

Da resposta imune à adaptação ao estresse do microambiente, a sinalização purinérgica vem emergindo como mecanismo-chave no CM pela capacidade de modular e regular processos críticos (AFFINITO *et al.*, 2024). Compreender como essa via altamente dinâmica sustenta a progressão tumoral e as alterações metabólicas acometidos ao MT é essencial. A hipóxia, por exemplo, promove remodelação da sinalização purinérgica em células de CMTN, incluindo aumento da expressão e da atividade do receptor P2X7 em células MDA-MB-231, favorecendo um fenótipo mais invasivo (DU *et al.*, 2024). Adicionalmente, a degradação do ATP extracelular pelas ectoenzimas CD39 e CD73 leva ao acúmulo de ADO, que interage com receptores como A2A e A2B (Figura 4), ativando cascatas intracelulares associadas à proliferação, angiogênese, evasão imunológica e remodelação tecidual. Evidências recentes destacam que essa via está intimamente ligada à progressão tumoral, metástase e resistência

terapêutica, especialmente no CMTN, tornando-se um alvo promissor para novas estratégias terapêuticas (ALLARD *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2024).

Figura 4. Esquema representativo da sinalização purinérgica mediada pelos receptores A2A e A2B no microambiente tumoral. Em condições de hipóxia ou morte celular, o ATP liberado é convertido sequencialmente em ADP, AMP e ADO pelas ectoenzimas CD39 e CD73. A adenosina extracelular, ao ativar os receptores A2A/A2B, promove imunossupressão, angiogênese e resistência à imunoterapia. O bloqueio dessa via por inibidores de receptores de adenosina ou anticorpos anti-CD39/CD73 restaura a imunidade antitumoral, favorecendo a atividade de linfócitos T, células *natural-killer* (NK) e macrófagos M1.



Fonte: Adaptado de Remley *et al.* (2023)

A2BR tem se destacado por seu papel multifuncional na biologia tumoral principalmente no CMTN. Sua expressão é regulada por condições como hipóxia e inflamação, frequentemente presentes no MT. Uma vez ativado pela ADO extracelular, o A2BR pode acionar diversas vias de sinalização intracelulares, como PI3K/Akt e STAT3 que estão fortemente associados à sobrevivência, à evasão imune e à angiogênese (ALLARD *et al.*, 2020; LAN *et al.*, 2018).

No CM, estudos demonstram que a sinalização ADO/A2BR está envolvida na manutenção do fenótipo de células-tronco tumorais via ativação da via p38 MAPK, bem como na promoção da migração e invasão celular (LAN *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2017). Segundo o autor a ativação do A2BR induz a expressão de citocinas como IL-6 e fatores pró-angiogênicos,

que intensificam a agressividade tumoral, sobretudo em subtipos mais agressivos como o CMTN. Estudos pré-clínicos também demonstraram a regressão tumoral após o bloqueio de receptores de ADO, inibição de ectoenzimas produtoras de ADO ou reversão da hipóxia tecidual (YEGUTKIN; BOISON, 2022). Essas evidências reforçam a relevância biológica da sinalização purinérgica via A2BR como um eixo chave na comunicação célula-célula no MT. Esse mesmo raciocínio abre espaço para a reflexão acerca das abordagens capazes de interferir nessas interações complexas. Nesse contexto, os produtos naturais (PN) vêm ganhando destaque, não apenas por sua atividade antitumoral direta, mas por sua capacidade de remodelar o MT de forma ampla e multifatorial.

1.4 Produtos naturais e sua capacidade de modelar o MT

Produtos naturais são substâncias químicas produzidas por organismos vivos como plantas, fungos, microrganismos ou animais (LES *et al.*, 2024). Em geral, muitos desses compostos derivam do metabolismo secundário ou especializado e, embora não estejam diretamente relacionados aos processos básicos de crescimento e desenvolvimento do organismo, podem desempenhar importantes funções protetivas, adaptativas e ecológicas (ATANASOV *et al.*, 2021). Nesse sentido, a pesquisa contemporânea em oncologia destaca a versatilidade dessas moléculas, capazes de interferir em processos como angiogênese, remodelamento tecidual, evasão imune e metabolismo tumoral, ampliando a compreensão de seu potencial como adjuvantes ou sensibilizadores em regimes terapêuticos já estabelecidos (YAO *et al.*, 2024).

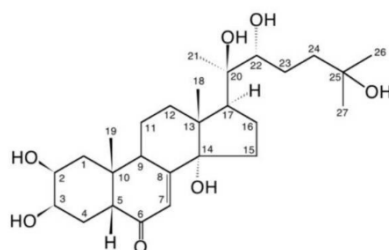
PNs têm sido explorados há milhares de anos e continuam sendo considerados importantes fontes para descoberta de novos medicamentos e compostos líderes. Com o avanço da química farmacêutica, compostos como os alcaloides da vinca e o paclitaxel, derivados dessas fontes naturais, consolidaram-se como importantes agentes utilizados na quimioterapia antineoplásica (IZZO; STEFANSKA, 2025).

Entre os diversos compostos ativos derivados de PNs, alguns fitoquímicos de origem vegetal têm recebido atenção especial por sua capacidade de modular processos celulares relacionados ao câncer. Os fitoquímicos são um conjunto amplo de metabólitos que inclui alcaloides, terpenoides, compostos fenólicos e diferentes classes de compostos esteroidais. Os ecdisteroides pertencentes a esse último grupo, são relacionados aos hormônios de muda encontrados em artrópodes e quando produzidos por plantas, esses compostos são denominados fitoeecdisteroides e estão principalmente associados a mecanismos de defesa contra insetos e

outros herbívoros (ARIF *et al.*, 2022).

Dentre esse grupo, destaca-se a Ecdisterona (20-hidroxiecdisona, 20E). Trata-se de um fitoecdisteroide caracterizado por uma estrutura esteroidal polihidroxilada, cuja presença de múltiplos grupos hidroxila confere propriedades físico-químicas particulares quando comparada aos esteroides vertebrados clássicos (Figura 5). Até o momento, mais de 500 fitoecdisteroides já foram descritos na natureza, sendo 20E um dos representantes mais comuns e amplamente estudados dessa classe (ARIF *et al.*, 2022).

Figura 5 – Estrutura da 20-hidroxiecdisona



Fonte: Zádor (2025).

A 20E ocorre em diversas espécies vegetais, incluindo *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, espécie pertencente à família Amaranthaceae e amplamente distribuída na América do Sul, especialmente no Brasil. Nessa espécie, a 20E é um dos constituintes mais característicos e o principal composto descrito em suas raízes. Além da 20E, *P. glomerata* apresenta outras classes de metabólitos, incluindo triterpenos, saponinas, flavonoides e polissacarídeos (RIBEIRO *et al.*, 2024). Reforçando sua relevância tanto fitoquímica como farmacológica.

Apesar de sua função fisiológica bem conhecida em artrópodes, o mecanismo de ação da Ecdisterona em mamíferos permanece pouco esclarecido. Alguns estudos sugerem que seus efeitos anabólicos podem envolver a ativação do receptor de estrogênio β (ER β), indicando uma possível capacidade de modular vias hormônio-dependentes de forma seletiva. No entanto, outros relatos destacam que fitoecdisteroides como a 20E são estruturalmente distintos dos esteroides vertebrados típicos, e muitas vezes não se espera que se liguem aos receptores esteroides clássicos (WADA, 2015).

Até o momento, grande parte das pesquisas envolvendo a 20E tem se concentrado em seus efeitos diretos sobre diferentes tipos celulares, incluindo as células tumorais. No contexto do CM, Shuvalov *et al.* (2020) demonstraram que a 20E pode interferir no metabolismo energético de células tumorais, promovendo redução da glicólise e da respiração celular, além

de modular processos relacionados à autofagia. Os autores também observaram interação favorável da 20E em associação com a doxorubicina em linhagens de câncer de mama, incluindo o CMTN, reforçando o interesse em investigar seu potencial como molécula adjuvante em estratégias antitumorais.

Contudo, os compostos derivados dos produtos naturais não atuam apenas como possíveis agentes citotóxicos diretos, mas também podem agir como moduladores do MT (REYTOR-GONZÁLEZ *et al.*, 2025). Diversos compostos naturais com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras de vias celulares têm demonstrado capacidade de interferir na comunicação entre células neoplásicas e componentes do estroma tumoral, incluindo fibroblastos, matriz extracelular e células imunes (TODOROVA *et al.*, 2024). Entretanto, essa atuação ainda é pouco compreendida especificamente para a 20E.

Portanto, apesar desse potencial, faltam estudos sistemáticos que investiguem de forma aprofundada como a 20E poderia remodelar o MT, permanecendo essa uma lacuna relevante para compreender seu real impacto no tratamento do CM. Dessa forma, formulamos a hipótese de que a 20E poderia interferir não apenas no comportamento das células tumorais, efeito já evidenciado em estudos anteriores, mas também na comunicação estabelecida entre células estromais, como os fibroblastos presentes no MT, possivelmente por mecanismos relacionados à sinalização purinérgica.

REFERÊNCIAS

- AFFINITO, A. *et al.* MCT4-driven cancer-associated fibroblast metabolism mediates metabolic coupling in breast cancer. **Cell Death & Disease**, v. 15, p. 141, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01910-x>.
- ALHARTHI, S. D. *et al.* Proteomic-Based Electrochemical Non-Invasive Biosensor for Early Breast Cancer Diagnosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 126681, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126681>.
- ALLARD, B.; ALLARD, D.; STAGG, J. On the mechanism of anti-CD39 immune checkpoint therapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 8, n. 1, p. e000186, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000186>.
- ALLARD, B. *et al.* The adenosine pathway in immuno-oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, p. 611–629, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0382-2>.
- ALLARD, B. *et al.* The Ectonucleotidases CD 39 and CD 73: Novel Checkpoint Inhibitor Targets. **Immunological Reviews**, v. 276, n. 1, p. 121–144, mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12528>.
- ALONSO-RON, C. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer Systemic Treatment: Disruptive Early-Stage Developments for Overcoming Stagnation in the Advanced Pipeline. **Cancers**, v. 17, n. 4, p. 633, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers17040633>.
- ARIF, Y. *et al.* Phytoecdysteroids: distribution, structural diversity, biosynthesis, and regulatory roles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8664, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23158664>.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 200-216, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.
- BECKER, L. M. *et al.* Epigenetic Reprogramming of Cancer-Associated Fibroblasts Deregulates Glucose Metabolism and Facilitates Progression of Breast Cancer. **Cell Reports**, v. 31, n. 9, p. 107701, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107701>.
- CAMPOS-CONTRERAS, A. D. R. *et al.* Adenosine Receptor A2B Negatively Regulates Cell Migration in Ovarian Carcinoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4585, abr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23094585>.
- CASSAVAUGH, J. *et al.* Impact of Estrogen on Purinergic Signaling in Microvascular Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 5, p. 2105, fev. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26052105>.
- CHEHAYEB, R. *et al.* Breastfeeding and triple-negative breast cancer: potential prevention and racial disparities. **npj Breast Cancer**, v. 11, n. 1, p. 35, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41523-025-00755-6>.

COHEN, S. Y. *et al.* Modifiable risk factors in women at high risk of breast cancer: a systematic review. **Breast Cancer Research**, v. 25, n. 1, art. 45, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-023-01636-1>.

CONTI, M. *et al.* Special Types of Breast Cancer: Clinical Behavior and Histopathological Features. **Diagnostics**, v. 10, n. 8, art. 182, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/jimaging10080182>.

DEAN, I. *et al.* Rapid functional impairment of natural killer cells following tumor entry limits anti-tumor immunity. **Nature Communications**, v. 15, art. 683, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44789-z>.

DERAKHSHAN, F.; REIS-FILHO, J. S. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 17, p. 181–204, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042420-093238>.

DI VIRGILIO, F. *et al.* Overview of the Role of Purinergic Signaling and Insights into Its Role in Cancer Therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 262, p. 108700, out. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2024.108700>.

DI VIRGILIO, F. *et al.* Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 18, n. 10, p. 601–618, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>.

DOGRA, A. K. *et al.* Prognostic significance and molecular classification of triple-negative breast cancer: a systematic review. **European Journal of Breast Health**, v. 21, n. 2, p. 101–114, 25 mar. 2025. DOI: <https://doi.org/10.4274/ejbh.galenos.2025.2024-10-2>.

DU, Y. *et al.* Role of the P2X7 receptor in breast cancer progression. **Purinergic Signalling**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11302-024-10039-6>.

FAN, Y.; HE, S. The characteristics of tumor microenvironment in triple negative breast cancer. **Cancer Management and Research**, v. 14, p. 1-17, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S316700>.

FAUBERT, B. *et al.* Metabolic Reprogramming and Cancer Progression. **Science**, v. 368, n. 6487, p. eaaw5473, abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>.

GARDANI, C. F. F. *et al.* The potential role of purinergic signaling in cancer therapy: perspectives on anti-CD73 strategies for prostate cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1455469, set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1455469>.

GUO, Z. *et al.* Tumor microenvironment and immunotherapy for triple-negative breast cancer. **Biomarker Research**, v. 12, n. 1, p. 63, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00714-6>.

HAN, S.; SUZUKI-KERR, H.; VLAJKOVIC, S. M.; THORNE, P. R. The developmental journey of therapies targeting purine receptors: from basic science to clinical trials. **Purinergic Signalling**, v. 18, p. 435–450, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11302-022-09896-w>.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HANAHAN, Douglas et al. Hallmarks of cancer: integrating tumor metabolism, immunity and systemic interactions. *Cell*, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2025.12.049>.

HARRIS, M. A. *et al.* Towards Targeting the Breast Cancer Immune Microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 24, n. 8, p. 554–577, ago. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00714-6>.

HASHEMI, F. *et al.* Global determinants of breast cancer mortality: A meta-analysis of 2.4 million women across 70 countries. **BMC Public Health**, v. 25, p. 143, 2025. DOI: [10.1186/s12889-025-24036-w](https://doi.org/10.1186/s12889-025-24036-w).

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Global Cancer Observatory**: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today>. Acesso em: 23 ago. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2026**: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2026. Disponível em: https://ninho.inca.gov.br/jspui/bitstream/123456789/17914/1/Estima2026_completo%20%281%29.pdf. Acesso em: 26 mar. 2026.

IZZO, A. A.; STEFANSKA, B. Natural products and cancer: From drug discovery to prevention and therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 182, n. 10, p. 2069–2074, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.70014>.

KANE, K. *et al.* The influence of endothelial metabolic reprogramming on the tumor microenvironment. **Oncogene**, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41388-024-03228-5>.

KASSIS, I. *et al.* Detection of breast cancer in digital breast tomosynthesis: improved sensitivity, specificity and receiver-operator characteristics. **Scientific Reports**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72707-2>.

KIM, J. *et al.* Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. **Nature Medicine**, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03502-3>.

KOZLOV, A. M. *et al.* Lactate preconditioning promotes a HIF-1 α -mediated switch in fibroblast metabolism. **Scientific Reports**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65193-9>.

LAN, J. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell enrichment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 41, p. E9640–E9648, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1809695115>.

LARSON, C. R. *et al.* The tumor microenvironment across four dimensions. **Frontiers in Immunology**, v. 16, p. 1554114, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1554114>.

LEE, J. J.; NG, K. Y.; BAKHTIAR, A. Extracellular matrix: unlocking new avenues in cancer treatment. **Biomarker Research**, v. 13, Art. 78, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-025-00757-3>.

LES, F. M. *et al.* Natural products in cancer therapy: current status and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 169, p. 115008, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115008>.

LI, C.; *et al.* Innate immune cells in tumor microenvironment: A new frontier in cancer immunotherapy. **iScience**, v. 27, n. 9, art. 110750, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110750>.

LI, K. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, p. 262, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00670-9>.

LI, M. *et al.* RNA Protein MSI2 Isoforms Expression and Regulation in Progression of Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 92, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01587-x>.

LI, Z. *et al.* Tumor microenvironment as a complex milieu driving cancer progression: a mini review. **Clinical and Translational Oncology**, v. 27, p. 1943–1952, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12094-024-03697-w>.

LIU, H. *et al.* MDSCs in breast cancer: an important enabler of tumor progression and therapy resistance. **Frontiers in Immunology**, v. 14, art. 1199273, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1199273>.

LIU, Y. *et al.* Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, art. 33, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0690-8>.

LIU, Y. *et al.* Advances in the Understanding of the Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Medicine**, v. 13, n. 22, p. e70410, nov. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.70410>.

LOIBL, S. *et al.* Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 35, n. 3, p. 159–182, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.11.016>.

LØYLAND, B. *et al.* Causes and risk factors of breast cancer, what do we know for sure? An evidence synthesis of systematic reviews and meta-analyses. **Cancers**, v. 16, n. 8, art. 1583, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers16081583>.

LUGANO, R. *et al.* Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 9, p. 1745–1770, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>.

MACAULAY, D. O. *et al.* Enhancing HER2 testing in breast cancer: predicting fluorescence in situ hybridization (FISH) scores from immunohistochemistry images via deep learning.

Journal of Pathology: Clinical Research, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/2056-4538.70024>.

MAQSOOD, Q. *et al.* Recent insights into breast cancer: molecular pathways and therapeutic targets. **Frontiers in Oncology**, v. 15, p. 1148861, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1148861>.

MATUSZEWSKA, K. *et al.* Normalizing tumor vasculature to reduce hypoxia, enhance perfusion and optimize therapy uptake. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4444, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13174444>.

MENES, T. S. *et al.* Clinical breast exam contribution to breast cancer diagnosis in BRCA mutation carriers vs. average to intermediate risk women. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 207, p. 111–118, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-024-07345-3>.

NAIR, R. *et al.* Deciphering T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 16, p. 1548234, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1548234>.

NICOSIA, L. *et al.* Breast Digital Tomosynthesis versus Contrast-Enhanced Mammography: a comparison of diagnostic performance. **European Journal of Radiology**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15092413>.

NOLAN, E. *et al.* Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, Cambridge, MA, v. 186, n. 8, p. 1708–1728, 13 abr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.040>.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. Breast Cancer: A Review of Risk Factors and Diagnosis. **Medicine**, v. 103, n. 3, p. e36905, jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>.

OBIDIRO, T. C. *et al.* Triple negative breast cancer treatment options and limitations: future outlook. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1796, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071796>.

PENG, H. *et al.* Biomechanics in the tumor microenvironment: physical signaling and implications for cancer progression. **eClinicalMedicine**, v. 24, p. 101394, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40164-024-00591-7>.

PERES, S. V. *et al.* Molecular subtypes as a prognostic breast cancer factor in women users of the São Paulo public health system, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 26, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1980-549720230028>.

QIN, D. *et al.* Targeting tumor-infiltrating tregs for improved antitumor responses. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1325946>.

REMLEY, V. A. *et al.* Unlocking antitumor immunity with adenosine receptor blockers. **Cancer Drug Resistance**, v. 6, 2023. DOI: <https://doi.org/10.20517/cdr.2023.63>.

REYTOR-GONZÁLEZ, C. *et al.* Natural bioactives as molecular modulators at the cancer–stroma interface. **Pharmaceutics**, v. 18, n. 2, p. 274, 2025. DOI:

<https://doi.org/10.3390/ph18020274>.

SABIT, H. *et al.* The role of tumor microenvironment and immune cell crosstalk in triple-negative breast cancer: emerging therapeutic opportunities. **Cancer Letters**, v. 628, p. 217865, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217865>.

SCARPELLINO, G. *et al.* Purinergic Calcium Signals in Tumor-Derived Endothelium. **Cancers**, Basel, v. 11, n. 6, art. 766, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11060766>.

SCHETTINI, F. *et al.* Efficacy and safety of antibody-drug conjugates in pretreated HER2-low metastatic breast cancer: A systematic review and network meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 126, p. 102865, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2024.102865>.

SHA, R. *et al.* Global burden of breast cancer and attributable risk factors in 204 countries and territories, from 1990 to 2021: results from the Global Burden of Disease Study 2021. **Biomarker Research**, v. 12, art. 87, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00631-8>.

SHARMA, A. *et al.* Development and prognostic validation of a three-level Nottingham Histologic Grade model in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 26, n. 45, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-024-01770-4>.

SHUVALOV, O. *et al.* An Arthropod Hormone, Ecdysterone, Inhibits the Growth of Breast Cancer Cells via Different Mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 561537, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.561537>.

SMOLARZ, B.; NOWAK, A. Z.; ROMANOWICZ, H. Breast cancer—Epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). **Cancers**, v. 14, n. 10, p. 2569, maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>.

STAVROU, M. *et al.* Tumor associated macrophages in breast cancer progression: implications and clinical relevance. **Frontiers in Immunology**, v. 15, art. 1441820, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1441820>.

TODOROVA, V. *et al.* Ecdysterone and turkesterone — Compounds with potential benefits in human nutrition: a review. **Nutrients**, v. 16, n. 9, p. 1382, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu16091382>.

VOLONTE, D. *et al.* Purinergic Signaling Promotes Premature Senescence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 300, n. 4, p. 107145, abr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107145>.

WADA, M. *Recent advances in ecdysteroid research in mammals*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 1849–1862, 2015. DOI: [10.1007/s00018-014-1810-9](https://doi.org/10.1007/s00018-014-1810-9).

USCANGA-PERALES, G. I. *et al.* Triple negative breast cancer: deciphering the biology and heterogeneity. **Medicina Universitaria**, v. 18, n. 71, p. 105–114, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2016.05.007>.

XIA, W. *et al.* Progress in targeting tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 16, art. 1658795, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1658795>.

XIANG, D. L.; YUE, X. Research progress of molecular typing and targeted therapy for triple-negative breast cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 15, 1666126, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1666126>.

XIONG, X. *et al.* Breast Cancer: Pathogenesis and Treatments. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 10, n. 1, p. 49, fev. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02108-4>.

XU, Q. *et al.* Cancer associated fibroblasts in cancer development and therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 18, n. 1, p. 15, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-025-01688-0>.

YAO, P. *et al.* A review of natural products targeting tumor immune microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1343316, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1343316>.

YASEEN, M. M. *et al.* Mechanisms of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells: the role of reactive oxygen species, nitric oxide and arginase-1. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 595, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.200111>.

YEGUTKIN, G. G.; BOISON, D. ATP and Adenosine Metabolism in Cancer: Exploitation for Therapeutic Gain. **Pharmacological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 799–824, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000528>.

YUAN, Z. *et al.* Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: from mechanisms to treatments. **Molecular Cancer**, v. 22, art. 48, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01744-8>.

ZÁDOR, Ernő. Molecular Targets of 20-Hydroxyecdysone in Mammals, Mechanism of Action: Is It a Calorie Restriction Mimetic and Anti-Aging Compound? **Cells**, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells14060431>.

ZHANG, S. *et al.* Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and evolution. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01848-7>.

ZHANG, X. Molecular Classification of Breast Cancer: Relevance and Challenges. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 147, n. 1, p. 46–51, jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2022-0070-RA>.

ZHOU, Y. *et al.* The adenosine A2B receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 48755–48768, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17835>.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da Ecdisterona sobre células de CMTN e como seu meio condicionado modula fenotipicamente e molecularmente fibroblastos humanos

Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da Ecdisterona sobre a migração de células de CMTN e HFF por meio de ensaios de migração horizontal e vertical;
- Investigar a influência do meio condicionado de células CMTN tratadas com Ecdisterona sobre o comportamento migratório de HFF;
- Investigar, *in silico*, o potencial da Ecdisterona em se ligar a CD73;
- Avaliar os efeitos do meio condicionado de células de CMTN tratadas com Ecdisterona sobre a expressão gênica de componentes da sinalização purinérgica em fibroblastos.

CAPÍTULO II

Ecdisterona interage computacionalmente com CD73 e o meio condicionado de células de câncer de mama triplo-negativo tratadas reduz a migração de fibroblastos normais

Gizele Pires de Moura^a, Fernanda Cardoso da Silva^a, Gislaine Gonçalves Rocha^a, Helen Soares Valença Ferreira^a, Henrique Gabriel Rodrigues Alves^a; Thaise Gonçalves Araújo^{a,b*}

^aLaboratório de Genética e Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, MG, Brasil. gizelepires1994@hotmail.com (G.P.M.); fernanda.cardoso95@yahoo.com (F.C.S.); gislaine.rocha08@gmail.com (G.G.R.); helensvalenca@gmail.com (H.S.V.F.); hrodriguesalves9@gmail.com (H.G.R.A.); tgaraujo@ufu.br (T.G.A.).

^bLaboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

* **Autor correspondente:** Thaise G. Araújo, Laboratório de Genética e Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Major Jerônimo, 566, Sala 601, 38700-002, Patos de Minas, MG, Brasil. Phone: +55 34 38142027. E-mail: tgaraujo@ufu.

Resumo

O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) é o subtipo mais agressivo de CM, caracterizado por um microambiente imunossupressor, no qual células tumorais e fibroblastos se comunicam para favorecer a progressão da doença. Compostos naturais têm emergido como alternativas promissoras para modular esse nicho e controlar de forma mais eficaz a doença. Neste estudo, foram investigados os efeitos da Ecdisterona (20E) sobre células de CMTN e a influência de seu meio condicionado sobre fibroblastos humanos. Células de CMTN (MDA-MB-231) foram tratadas com concentrações não citotóxicas de 20E e o meio condicionado foi utilizado para avaliar a migração de fibroblastos (HFF). Para prever o potencial de 20E de se ligar a componentes da sinalização purinérgica, foram realizados ensaios *in silico* de *docking* molecular utilizando como alvos a enzima CD73 e os receptores A2A e A2B, comparando a 20E com os ligantes fisiológicos, monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina (ADO), e os inibidores químicos de referência OP-5244, PSB1115 e ZM241385, respectivamente. A 20E reduziu a capacidade migratória das células de CMTN e de fibroblastos tratados com o meio condicionado. Quanto à participação de enzimas e receptores da sinalização purinérgica, as análises computacionais revelaram que 20E possui energia de ligação de $-9,2$ kcal/mol para CD73, superando o AMP e igualando-se aos inibidores sintéticos, bloqueando a fenda catalítica por meio da interação vital com His243, Leu184 e Ser221. Em relação aos receptores A2A e A2B, a 20E apresentou afinidades de $-8,2$ kcal/mol e $-7,1$ kcal/mol, respectivamente. Em ambos os casos, superou a afinidade da ADO ($-6,9$ kcal/mol para o A2A e $-6,3$ kcal/mol para o A2B), ancorando-se nos mesmos bolsões dos antagonistas sintéticos e estabelecendo ligações de hidrogênio essenciais, como a Glu169 e Ala59 no A2A e Leu172 e Asn254 no A2B. Nos fibroblastos tratados com meio condicionado, os transcritos de *ADORA2B* foram significativamente reduzidos enquanto os de *NT5E* foram aumentados. Em conjunto, os resultados sugerem que a 20E interfere tanto no comportamento das células tumorais quanto na comunicação tumor-estroma, apontando a sinalização purinérgica como um possível mecanismo de ação desse fitoecdisteroide.

Palavras-chave: Fitoesteroide, Ecdisterona, Adenosina, *Docking* molecular; Microambiente tumoral.

Introdução

O câncer de mama (CM) é o câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo, com cerca de 2,3 milhões de novos casos registrados anualmente (KIM *et al.*, 2025). Destes, cerca de 10-20% são classificados como triplo-negativos (TN), não expressando receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2). Clinicamente, o CMTN é altamente agressivo, de rápida progressão, de pior prognóstico e com opções de tratamento limitadas (SABIT, H. *et al.*, 2025). A taxa de mortalidade desse subtipo é a mais alta (LEBEDEVA *et al.*, 2025), evidenciando quão desafiador tem sido compreender sua heterogeneidade e desenvolver novas estratégias terapêuticas, sobretudo diante das evidências crescentes sobre o papel crítico do microambiente tumoral (MT) nesse cenário (BROGNA *et al.*, 2025).

O MT no CMTN é um ecossistema complexo e dinâmico composto por células imunes e células estromais, especialmente fibroblastos associados ao câncer (CAFs), que produzem e remodelam a matriz extracelular (ME). A literatura descreve a origem dos CAFs a partir da ativação de fibroblastos residentes, os quais passam a produzir TGF- β e a expressar, principalmente, α -SMA e FAP (FOTSITZOU *et al.*, 2022). Os fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas secretados pelos CAFs, por sua vez, suportam a progressão tumoral ao ativar importantes vias de sinalização envolvidas em mecanismos-chave como angiogênese, invasão, imunossupressão, resistência a medicamentos, manutenção da pluripotência e reprogramação metabólica (HURTADO *et al.*, 2020).

Mecanicamente, a sinalização purinérgica pode modular o MT, a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e a imunidade antitumoral. As células tumorais produzem pelo menos 10% mais ATP do que as células normais em decorrência do efeito Warburg, e o ATP intracelular é uma fonte primária para a liberação de purinas extracelulares no MT (JIA *et al.*, 2023). A sinalização ocorre através de ectonucleotidases como CD39 (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1, ENTPD1) e CD73 (ecto-5'-nucleotidase, NT5E), que medeiam a hidrólise de ATP, ADP e AMP e, consequentemente, o acúmulo extracelular de adenosina (ADO) (DI VIRGILIO *et al.*, 2024). Portanto, a degradação de ATP leva ao acúmulo de ADO, que, por sua vez, interage com receptores como A2A e A2B, ativando mecanismos pró-tumorais e de resistência terapêutica como proliferação, migração e evasão imune (AFFINITO *et al.*, 2024).

Yu e coautores (2020) demonstraram que CAFs são células CD73^{hi} presentes no microambiente de câncer colorretal, sendo sua expressão regulada pelos níveis de ADO e pela

ativação dos receptores A2B, o que promove a supressão de células T (YU *et al.*, 2020). Nesse contexto, a modulação da sinalização purinérgica e da expressão de A2B em tumores cujo microambiente é rico em CAFs mostra-se interessante, ao permitir aliviar o ponto de controle imunológico mediado por CAF-CD73. CAFs são abundantes no CMTN, regulando o microambiente imunossupressor e a resistência terapêutica (WANG *et al.*, 2023). Nesses tumores, o eixo CAF-CD73 ainda não foi descrito, sobretudo considerando-o como um alvo para novas terapias.

Produtos naturais têm despertado crescente interesse na pesquisa oncológica por sua capacidade de interferir em vias metabólicas, inflamatórias e imunológicas envolvidas na progressão tumoral. Entre esses compostos bioativos, destaca-se a ecdisterona (20-hydroxyecdysone – 20E), um fitoecdisteroide regulador do metabolismo energético e da resposta imune em células de CM (SHUVALOV *et al.*, 2020). Contudo, sua influência na modulação funcional das CAFs via sinalização purinérgica no CMTN ainda é uma lacuna relevante a ser explorada. Hipotetizamos que seus efeitos sobre as células de CMTN estejam correlacionados à regulação da sinalização purinérgica em CAFs, envolvendo alterações nas atividades das enzimas CD39/CD73 e no perfil de citocinas. Assim, este estudo objetivou investigar os efeitos da 20E sobre células MDA-MB-231 e como seu meio condicionado modula alterações celulares, bioquímicas e moleculares em CAFs, com foco na sinalização purinérgica.

Material e métodos

Cultivo Celular

As linhagens MDA-MB-231 (CMTN #CRM-HTB-26TM) e de fibroblastos humanos (HFF-1 #SCRC-1041) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC®). As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio L15 (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco) e mantidas em atmosfera sem CO₂. As células HFF foram cultivadas em DMEM com alto teor de glicose (Gibco) e 15% de SFB em atmosfera contendo 5% de CO₂. Todas foram suplementadas com Antibiotic-Antimycotic 1% (Gibco) e cultivadas a 37 °C em atmosfera úmida até atingirem aproximadamente 80% de confluência, condição em que foram utilizadas nos experimentos subsequentes. As células foram confirmadas como livres de micoplasma.

Viabilidade Celular

A Ecdisterona (20E-95% de pureza), adquirida da empresa Sigma Aldrich, foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO – 0,5%) e utilizada nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 μM , já previamente descritas como não citotóxicas às linhagens MCF7 e MDA-MB231 (SHUVALOV *et al.*, 2020). Células MDA-MB-231 e HFF foram semeadas em placas de 96 poços nas densidades de $1,5 \times 10^4$ e $8,0 \times 10^3$ células por poço, respectivamente, e mantidas por 24 horas para adesão e estabilização. Em seguida, foram tratadas com 20E por um período de 48 horas, quando 10 μL de solução do reagente MTT (3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide - Invitrogen, Waltham, MA, USA - 5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e mantidos em condições ideais de cultivo. Após a remoção do meio, 100 μL de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 560 nm utilizando o Multiskan FC Microplate Reader TM FC (Thermo Fisher Scientific®) e a viabilidade foi calculada por meio da seguinte fórmula: $\text{Citotoxicidade (\%)} = [(\text{absorbância das células tratadas com o composto} / \text{média da absorbância do controle}) \times 100]$

Obtenção do Meio Condicionado

As células MDA-MB-231 foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm^2 e tratadas por 48 horas com 20E nas concentrações não-citotóxicas de 250 μM , 350 μM e 500 μM . A concentração de 800 μM não foi incluída por corresponder à metade da concentração inibitória média (IC_{50}) já descrita para a linhagem MDA-MB-231 (SHUVALOV *et al.*, 2020). Após esse período, o meio foi removido e substituído por meio de cultivo da HFF completo livre de tratamento. Decorridas 24 horas, o meio condicionado resultante foi coletado, centrifugado a $1000 \times g$ por 10 minutos, filtrado em membrana de 0,22 μm (Kasvi, Pinhais, PR, Brasil) e utilizado imediatamente. O meio condicionado controle, proveniente das células MDA-MB-231 não expostas à 20E, foi coletado nas mesmas condições.

Migração horizontal

A migração horizontal foi avaliada pelo método de cicatrização de feridas (*wound healing*) nas células MDA-MB-231 e HFF, tratadas diretamente com 20E, e em células HFF tratadas com meio condicionado. Para isso, as duas linhagens foram semeadas em placas de 12

poços (2×10^5 células/poço) com o meio de cultivo apropriado para o crescimento de uma monocamada por 24 horas. Em seguida, uma ponta de pipeta estéril de 20–200 μL foi segurada verticalmente para introduzir um risco em cada poço. Os poços foram, então, lavados com tampão fosfato salino (PBS) 1x. Foram realizados os tratamentos diretos com 20E nas concentrações de 100 μM , 150 μM , 250 μM , 350 μM e 500 μM e as células HFF foram tratadas com meio condicionado conforme descrito acima. Imagens representativas foram capturadas nos intervalos de 0, 24 e 48 horas. Células não tratadas foram incluídas como controle. A análise foi realizada utilizando o software ImageJ v. 1.54g, e o fechamento da ferida foi medido em percentual, utilizando a seguinte fórmula: $(\text{Área Inicial} - \text{Área Final}) / \text{Área Inicial} \times 100$. Os poços que obtiveram fechamento completo da ferida atingiram 100% de migração.

Migração vertical

Para a avaliação da migração vertical, membranas com poros de 8 μm (Greiner Bio-one, Alphen a/d Rijn, Holanda) foram usadas em um formato de 24 poços, conforme metodologia previamente descrita por Gimenes *et al.* (2017) com algumas modificações. Inicialmente, células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) foram desagregadas e incubadas com 20E diluída em meio sem SFB nas concentrações de 250 μM , 350 μM e 500 μM . Células não tratadas também foram incluídas como controle positivo. Ao término da pré-incubação, as células foram transferidas para a porção superior das câmaras transwell já hidratadas por 15 minutos com meio completo, enquanto o compartimento inferior recebeu 600 μL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB, utilizado como quimioatraente. Poços contendo meio sem suplementação no compartimento inferior também foram incluídos como controle negativo. Decorridas 24 horas de incubação, as células que migraram foram fixadas após coleta com swab e coradas de acordo com o fabricante utilizando o kit Panótico (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). A visualização foi realizada em microscópio óptico Leica ICC50 HD optical microscope (Leica, Wetzlar, HE, Germany), e imagens representativas foram capturadas com aumento de 10 $\times$. A quantificação das células foi efetuada com o auxílio do software ImageJ (versão 1.54g).

A migração vertical de células HFF (5×10^4 células/poço) tratadas com meio condicionado (5×10^4 células/poço) também foi realizada conforme conduzido para as células MDA-MB231.

Análises *in silico*

O estudo de *docking* molecular foi conduzido com o objetivo de investigar as interações intermoleculares entre 20E, CD73, A2A e A2B. Para os cálculos de *docking*, as estruturas cristalográficas tridimensionais dos alvos foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB) sob os códigos 4H2I (Knapp *et al.*, 2012), 3EML (Jaakola *et al.*, 2008) e 8HDP (Cai *et al.*, 2022), respectivamente.

Todas as estruturas macromoleculares foram previamente preparadas mediante a remoção de moléculas de água cristalográficas, íons não funcionais como sulfato, cloreto e sódio e ligantes irrelevantes para o mecanismo de ação em estudo como ácido esteárico e colesterol. Vale ressaltar que, para o alvo 4H2I (CD73), os íons zinco (Zn^{2+}) foram mantidos, uma vez que são fundamentais para a estabilidade estrutural e coordenação do substrato no sítio catalítico da enzima CD73 (Knapp *et al.*, 2012).

Seguindo protocolos computacionais consolidados, os ligantes cocrystalizados nas estruturas do PDB foram utilizados como parâmetros de referência para a definição da caixa de busca (*grid box*). Para a enzima CD73, adotaram-se as coordenadas do inibidor cristalizado A12 (éster adenosílico do ácido fosfometilfosfônico); para o receptor A2A, as coordenadas do inibidor ZMA (ZM241385); e para o receptor A2B, utilizou-se a cadeia R, que continha a adenosina (ADO), como referência para mapear o sítio ortostérico. A validação espacial do protocolo foi realizada por meio de *redocking*, obtendo-se valores de Desvio Quadrático Médio (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) de 1,891 Å para o A12, 1,224 Å para o ZMA e 0,742 Å para a ADO. Tais valores comprovam o método, enquadrando-se no limite de aceitação universal de $\leq 2,0$ Å (Hevener *et al.*, 2009).

Devido à expressiva similaridade estrutural entre os receptores A2A (3EML) e A2B (8HDP) (RMSD de 1,55 Å), procedeu-se ao alinhamento tridimensional de ambos, permitindo a padronização das coordenadas da matriz de busca. A sobreposição tridimensional destes receptores e a representação da caixa de busca podem ser visualizadas no Apêndice A, gerada no programa PyMOL com o *plugin* DockingPie 1.2 (Rosignoli & Paiardini, 2022).

As estruturas 3D da 20E, ADO, AMP e dos inibidores OP-5244 e PSB1115 foram obtidas na base de dados PubChem sob os identificadores CID: 118701161, 60961, 6083, 154585769 e 5311479, respectivamente. Como citado anteriormente, os ligantes ZMA e A12 já se encontravam co-cristalizados nas estruturas do PDB. O ADO e AMP são ligantes fisiológicos nativos do organismo, incluídos no estudo como comparação dos *scores* com o 20E.

As estruturas químicas foram otimizadas empregando-se o método Hamiltoniano semiempírico PM7 por meio do pacote MOPAC2016, visando obter conformações de energia minimizada (Stewart, 2013; Stewart, 2016). Antes da otimização geométrica, os estados de

protonação fisiológicos dos ligantes em pH 7,4 foram devidamente atribuídos. Este protocolo de preparação de ligantes é bem estabelecido na literatura de planejamento de fármacos baseados em estrutura (Ferreira *et al.*, 2015). Posteriormente, os arquivos foram convertidos para o formato PDBQT utilizando o programa Open Babel (O'Boyle *et al.*, 2011).

Os cálculos de *docking* molecular foram conduzidos no software AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) para avaliar as energias de afinidade dos compostos com os três alvos selecionados. Para todas as macromoléculas, a caixa envolvendo o sítio de ligação teve dimensões fixadas em $25 \times 25 \times 25$ Å, com espaçamento de 1 Å. Para garantir uma busca conformacional rigorosa e evitar o aprisionamento em mínimos locais de energia, o parâmetro de exaustividade foi elevado para 16, e o número máximo de modos de ligação gerados foi definido como 20. As coordenadas cartesianas (x , y , z) do centro da caixa para a estrutura 4H2I foram -15.761, 19.588, -33.212, e 114.250, 97.544, 79.049 para os receptores de adenosina 3EML e 8HDP.

Durante as simulações, as conformações dos ligantes foram tratadas como totalmente flexíveis, enquanto as estruturas dos receptores foram mantidas rígidas. Este protocolo padronizado foi recentemente validado e aplicado com sucesso (Santiago *et al.*, 2025). Por fim, as poses de maior afinidade e as redes de interações intermoleculares foram analisadas e renderizadas utilizando o PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System*, Versão 2.0, Schrödinger, LLC; DeLano, 2009) e o *Discovery Studio Visualizer* (Versão 25.1.0.0; Biovia, 2025).

RT-qPCR

A linhagem HFF foi tratada com meio condicionado para extração do RNA total utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. Em seguida, 1 µg de RNA total foi utilizado para transcrição reversa e obtenção do cDNA utilizando M-MLV RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, US). Os alvos descritos na Tabela 1 foram amplificados por PCR em tempo real (qPCR) em termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems). As reações técnicas foram realizadas em triplicata utilizando Power SYBR Green SuperMix (Applied Biosystems) e volume final de trabalho de 10 µl, contendo 5 µl de SuperMix, 1 µl de solução estoque de primer a 5 µM e 2 µl de cDNA. Os parâmetros de ciclagem compreenderam uma etapa inicial de desnaturação por 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos). O gene hipoxantina fosforiltransferase (*HPRT*) foi utilizado como referência. A expressão

relativa foi calculada pelo método Cq comparativo

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na qPCR

Gene	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Amplicon (pb)
<i>HPRT</i>	GCTGAGGATTTGGAAAGGGTG	GGCCTCCCATCTCCTTCATC	94
<i>ADORA2A</i>	TCGCCATTGACCGCTACATTGC	AAACGACAGCACCCAGCAGATG	107
<i>ADORA2B</i>	TCCATCTTCAGCCTTCTGGC	AAAGGCAAGGACCCAGAGGA	129
<i>NT5E</i>	TGTGGTGGAGAGGAGCCTCA	GCTGAACCACTTGTCTTCTGAC	142

HPRT (Hipopoxantina Fosforibosiltransferase); *ADORA2A* (Receptor de Adenosina A2A); *ADORA2B* (Receptor de Adenosina 2B); *NT5E* (ecto-5'-nucleotidase).

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) e analisados pelo GraphPad Prism 9.0 (EUA). Para a comparação entre os grupos de estudo, foi empregado o teste one-way ANOVA seguido de uma análise post-hoc utilizando o teste de Tukey e Dunnet. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

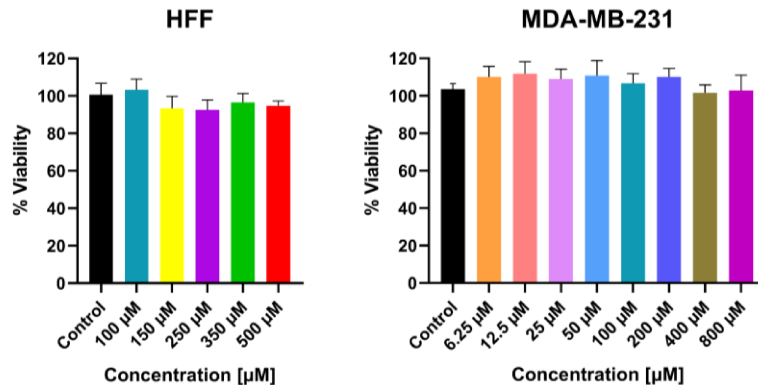
Resultados

Citotoxicidade da Ecdisterona

Em estudo prévio, foi avaliado o efeito da 20E sobre a viabilidade das linhagens MDA-MB-231, com valores de IC_{50} de 1757.5 μ M, após 48 horas (SHUVALOV *et al.*, 2020). Presentemente, confirmamos que as concentrações utilizadas (de 6,5 μ M a 800 μ M) não são, de fato, citotóxicas às células de CMTN (Figura 1). As células HFF também foram tratadas (100 μ M – 500 μ M), sem que se verificasse alterações significativas na viabilidade de fibroblastos

Figura 1. Teste de MTT após tratamento das linhagens HFF e MDA-MB-231 com diferentes concentrações de Ecdisterona por 48 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Não foram observadas diferenças

significativas.



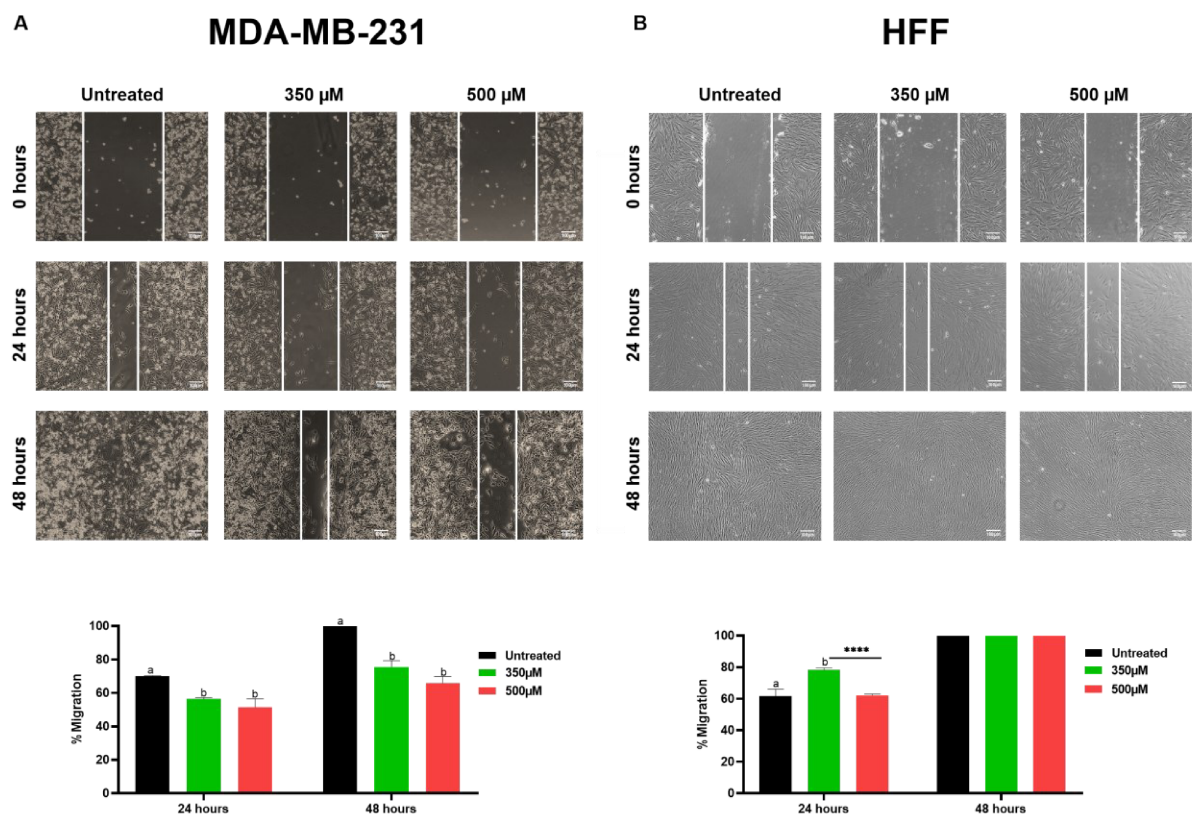
Efeito da Ecdisterona sobre a migração horizontal

Embora a viabilidade das linhagens não tenha sido modificada pelo tratamento com 20E, esse composto natural pode regular células tumorais por diferentes mecanismos (Shuvalov *et al.*, 2020). Assim, a capacidade de inibir a migração horizontal foi analisada por meio do ensaio de “cicatrização de feridas”, já que é um método amplamente utilizado para investigar a capacidade de deslocamento e reparo coletivo das células em cultura. Em estudos sobre CM, esse ensaio tem sido essencial para compreender mecanismos associados à motilidade, adesão e plasticidade celular, características diretamente relacionadas ao potencial metastático e à agressividade tumoral (Bar-Hai *et al.*, 2024; Xu *et al.*, 2025).

As células foram, então, tratadas por 48 horas com as concentrações de 100 µM, 150 µM, 250 µM, 350 µM e 500 µM de 20E. A maior concentração (800 µM) não foi incluída por corresponder à metade do valor de IC₅₀ já publicado (Shuvalov *et al.*, 2020). Inicialmente, o ensaio foi conduzido nas células MDA-MB-231 com tratamentos por 24 e 48 horas (Figura 2). Na Figura 2A, apenas as concentrações de 350 µM e 500 µM, por se mostrarem significativas, são apresentadas, e os demais resultados estão descritos no Apêndice B. Estatisticamente, o tratamento com 20E promoveu uma diminuição significativa da taxa de migração das células de CMTN em comparação ao grupo controle tanto para 24 horas como para 48 horas. Na linhagem de fibroblastos humanos ocorreu o fechamento completo das feridas geradas para todos os tratamentos com 350 µM e 500 µM, com uma taxa de 100% após o período de 48 horas (Figura 2B e Apêndice C).

Figura 2. Efeitos da Ecdisterona sobre a migração horizontal das células de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e fibroblastos humanos (HFF). (A) Células MDA-MB-231

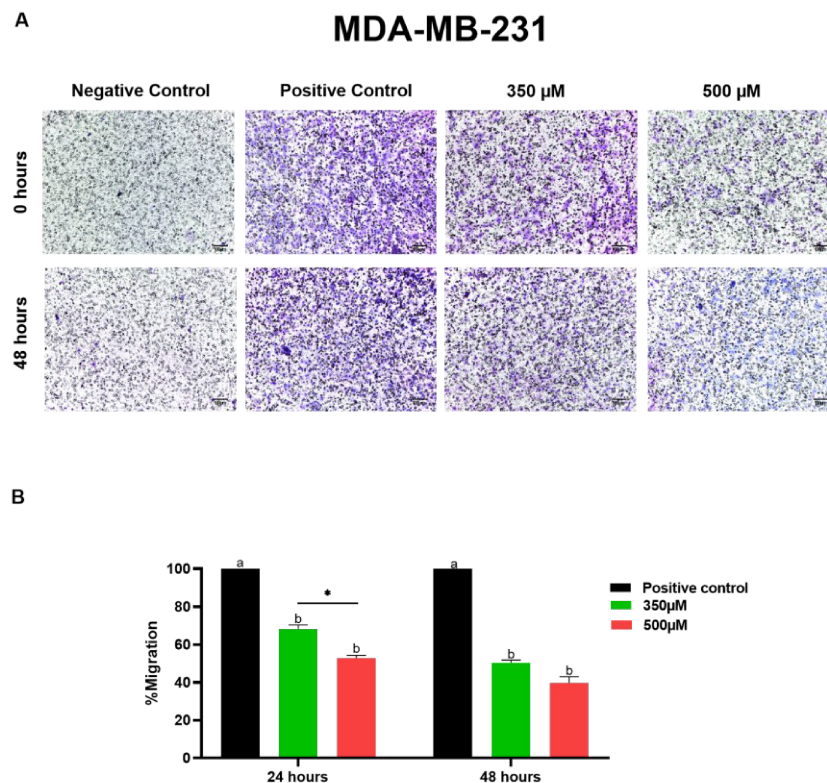
confluentes foram lesionadas e tratadas com Ecdisterona nas concentrações de 350 μ M e 500 μ M. A largura das ranhuras foi avaliada nos tempos 0, 24 e 48 horas por microscopia óptica (100 $\times$), seguida da quantificação da migração celular. (B) Células HFF confluentes foram submetidas ao mesmo protocolo experimental e a migração foi avaliada após 0, 24 e 48 horas de tratamento. As imagens representativas e os gráficos mostram a porcentagem de migração celular em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com n = 3 repetições. Os valores de p são representados por *** ($p < 0,001$). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.



Efeitos da Ecdisterona sobre a migração celular vertical de células de CMTN

A influência da 20E sobre a migração vertical das células de CMTN também foi investigada. Para isso foram utilizadas câmaras Transwell, simulando *in vitro* a migração dirigida que precede a invasão tumoral (CHOI *et al.*, 2024; DU *et al.*, 2025; HONG *et al.*, 2022). Células MDA-MB-231 foram tratadas por 24 e 48 horas com as concentrações de 250 μ M, 350 μ M e 500 μ M de 20E (Apêndice D). Nos tratamentos com 350 μ M e 500 μ M ocorreu a inibição da migração vertical, diferindo do controle nos dois tempos experimentais (Figuras 3A e 3B).

Figura 3. Efeitos da Ecdisterona sobre a migração vertical das células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231. (A) Fotografias microscópicas do ensaio Transwell realizado por 24 e 48 horas. (B) Representação gráfica da migração vertical. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n = 3$ repetições. Os valores de p são representados por * ($p < 0,05$). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.

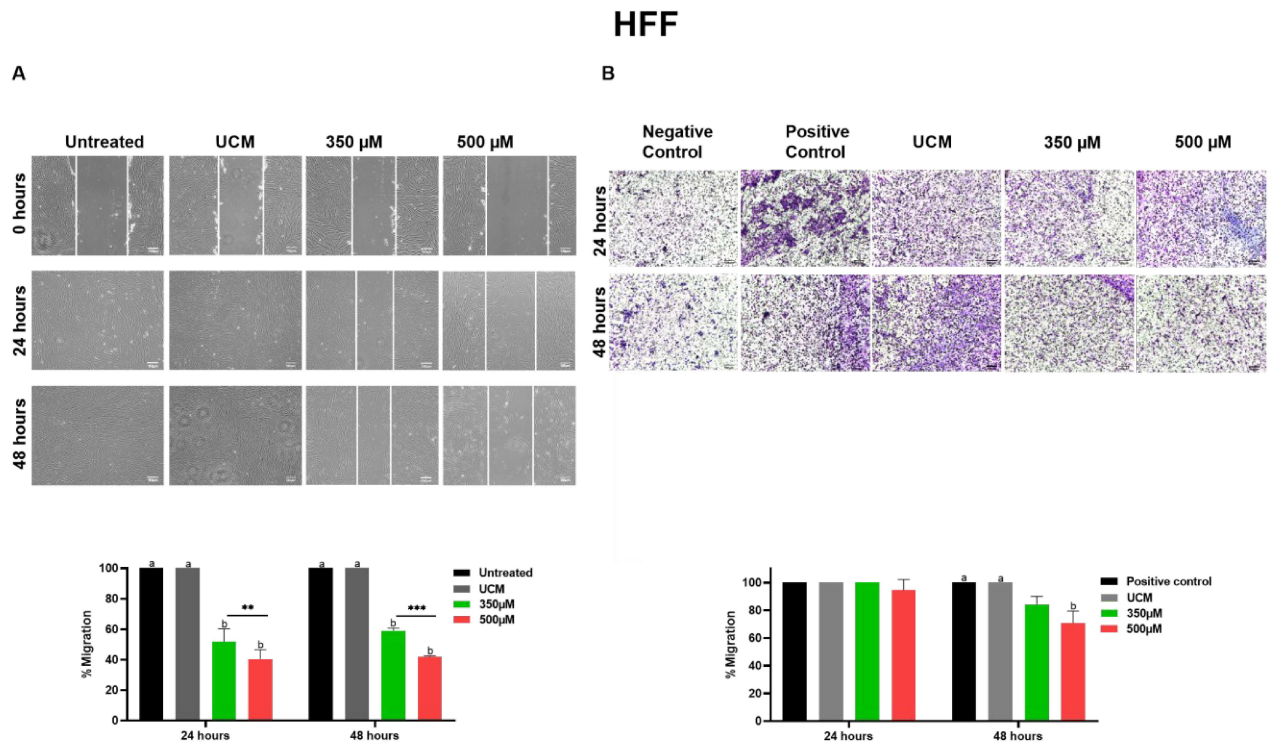


Efeitos do meio condicionado sobre a migração de fibroblastos

Em seguida foi avaliada a migração horizontal e vertical da HFF utilizando meio condicionado proveniente das células MDA-MB-231 tratadas com 20E. Após o período de 48 horas a taxa de migração horizontal da HFF diminuiu nas concentrações testadas, sendo em média 53%, 59% e 42% para 250 μ M, 350 μ M e 500 μ M, respectivamente (Figura 4A e Apêndice E). Em ambos os controles, HFF com apenas meio de cultivo e HFF expostas ao meio condicionado sem tratamento com 20E (UCM – do inglês, *Untreated Conditioned Medium*) apresentaram completo fechamento da ranhura (Figura 4A). Na análise da migração vertical, conduzida nas mesmas concentrações (Figura 4B e Apêndice F), não foram observadas

diferenças estatisticamente significativas entre os grupos após 24 horas de tratamento. Após 48 horas, a concentração de 500 μM promoveu redução significativa da migração celular em relação ao controle positivo e ao UCM (Figura 4B).

Figura 4. Efeitos do meio condicionado de células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) tratadas com Ecdisterona sobre a migração horizontal e vertical de fibroblastos humanos (HFF). (A) Ensaio de migração horizontal (*wound healing*): células HFF confluentes foram lesionadas e tratadas com meio condicionado proveniente de células MDA-MB-231 tratadas com Ecdisterona. A largura das ranhuras foi acompanhada após 0, 24 e 48 horas por microscopia óptica (100 $\times$), seguida da representação quantitativa da porcentagem de migração. (B) Ensaio de migração vertical (Transwell): células HFF foram tratados com meio condicionado e avaliados após 24 e 48 horas. São apresentadas imagens representativas do ensaio e a quantificação da migração celular. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão, com $n = 3$ repetições independentes. Os valores de significância estatística são indicados por *** ($p < 0,001$) e ** ($p < 0,01$). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.



Docking molecular da Ecdisterona com CD73, A2A e A2B

O estudo *in silico* avaliou a capacidade da 20E em interagir com as cavidades catalítica e ortostérica dos alvos CD73, A2A e A2B, respectivamente. Para estabelecer um racional de inibição competitiva, ligantes endógenos (ADO e AMP) e inibidores de relevância oncológica (OP-5244, ZM241385 e PSB1115) foram utilizados como controles comparativos (Tabela 2).

Tabela 2. Afinidades (calculadas pelo AutoDock Vina em kcal/mol e representadas entre parênteses) de ligação dos compostos analisados no docking molecular para os alvos CD73, A2a e A2B

Categoria	Alvo		
	CD73	A2A	A2B
Fitoecdisteroide	20E (-9,2)	20E (-8,2)	20E (-7,1)
Ligante cristalográfico	A12 (-9,0)	ZMA (-9,0)	ADO (-6,0)
Ligante endógeno	AMP (-7,9)	ADO (-6,9)	ADO (-6,3)
Inibidor	OP-5244 (-9,0)	ZM241385 (-9,0)	PSB1115 (-7,6)

CD73 (Ecto-5'-nucleotidase); A2A (Receptor de Adenosina A2A); A2B (Receptor de Adenosina A2B); 20E (20-hidroxicdisona); A12(Éster Adenosílico do Ácido Fosfometilfosfônico); ZMA/ZM241385(Ligante cristalográfico e antagonista do receptor A2A); ADO (Adenosina); AMP (Adenosina Monofosfato); OP-5244 (Inibidor de CD73); PSB1115 (Antagonista do Receptor de Adenosina A2B). Os valores entre parênteses representam a energia de afinidade de ligação predita pelo AutoDock Vina, expressa em kcal/mol.

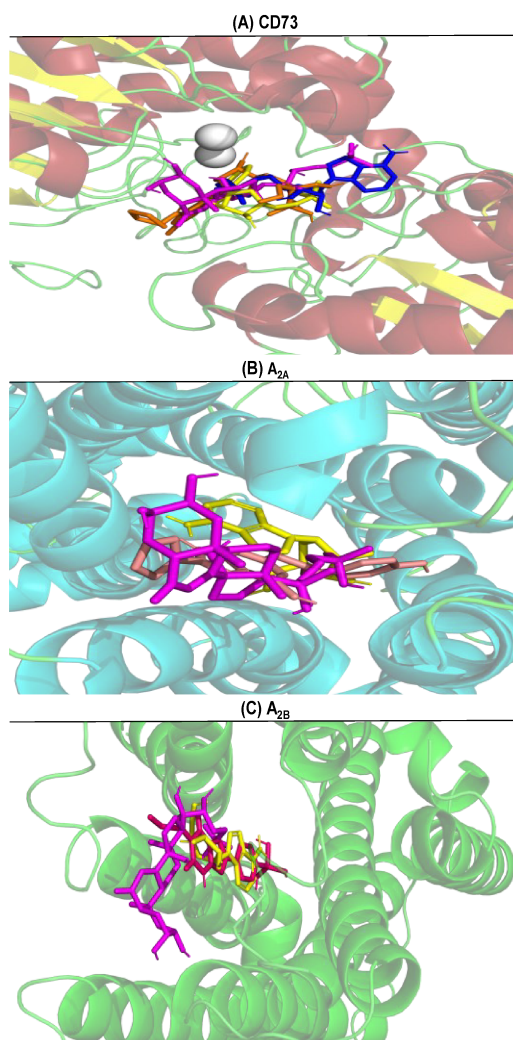
A análise comparativa das energias de afinidade revelou um perfil de interação termodinamicamente promissor para a 20E, destacando seu potencial como um modulador multialvo da via purinérgica. O valor mais expressivo foi observado na enzima CD73, na qual a 20E apresentou uma energia livre de ligação de -9,2 kcal/mol, superando não apenas a afinidade do substrato endógeno AMP (-7,9 kcal/mol), como também mostrando uma ancoragem superior aos controles de alto rigor metodológico, sobrepondo-se levemente ao ligante cristalográfico A12 e ao inibidor de relevância clínica OP-5244 (ambos com -9,0 kcal/mol). Esse perfil energético sugere uma forte probabilidade de inibição competitiva da CD73 pelo fitoecdisteroide.

Paralelamente, nos receptores acoplados à proteína G, a 20E demonstrou uma capacidade preditiva de antagonismo. No receptor A2A, a afinidade do fitoecdisteroide (-8,2 kcal/mol) foi substancialmente mais favorável do que a do seu agonista natural, a ADO (-6,9 kcal/mol),

mantendo-se em uma faixa competitiva em relação ao potente inibidor de referência ZM241385 (−9,0 kcal/mol). O mesmo padrão de superioridade termodinâmica frente ao ligante endógeno foi reproduzido no receptor A2B, no qual a 20E (−7,1 kcal/mol) superou a ADO (−6,3 kcal/mol) e aproximou-se significativamente do inibidor seletivo PSB1115 (−7,6 kcal/mol).

A análise estrutural da Figura 5A justifica a equivalência nos valores de afinidade entre a (−9,2 kcal/mol), o A12 e o OP-5244 (ambos com −9,0 kcal/mol). Todas essas moléculas preenchem de forma ideal a ampla fenda catalítica adjacente aos íons Zn^{2+} (esferas brancas). O fato de o inibidor sintético (OP-5244) e 20E ocuparem rigorosamente o mesmo volume espacial comprova que o composto natural possui impedimento estérico suficiente para bloquear fisicamente a entrada do substrato natural no sítio ativo da enzima.

Figure 5. Resultados de docking da melhor pose de ligação entre a Ecdisterona (20E) e componentes da sinalização purinérgica. (A) Ligação com CD73. (B) Ligação com A2A. (C) Ligação com A2B. As estruturas de 4H2I, 3EML e 8HDP são representadas em vermelho, ciano e verde, respectivamente. O íon Zn^{2+} é destacado como uma esfera branca, A12 em azul, Adenosina (ADO) em amarelo, 20E em magenta, OP-5244 em laranja, ZMA em salmão e PSB1115 em rosa.

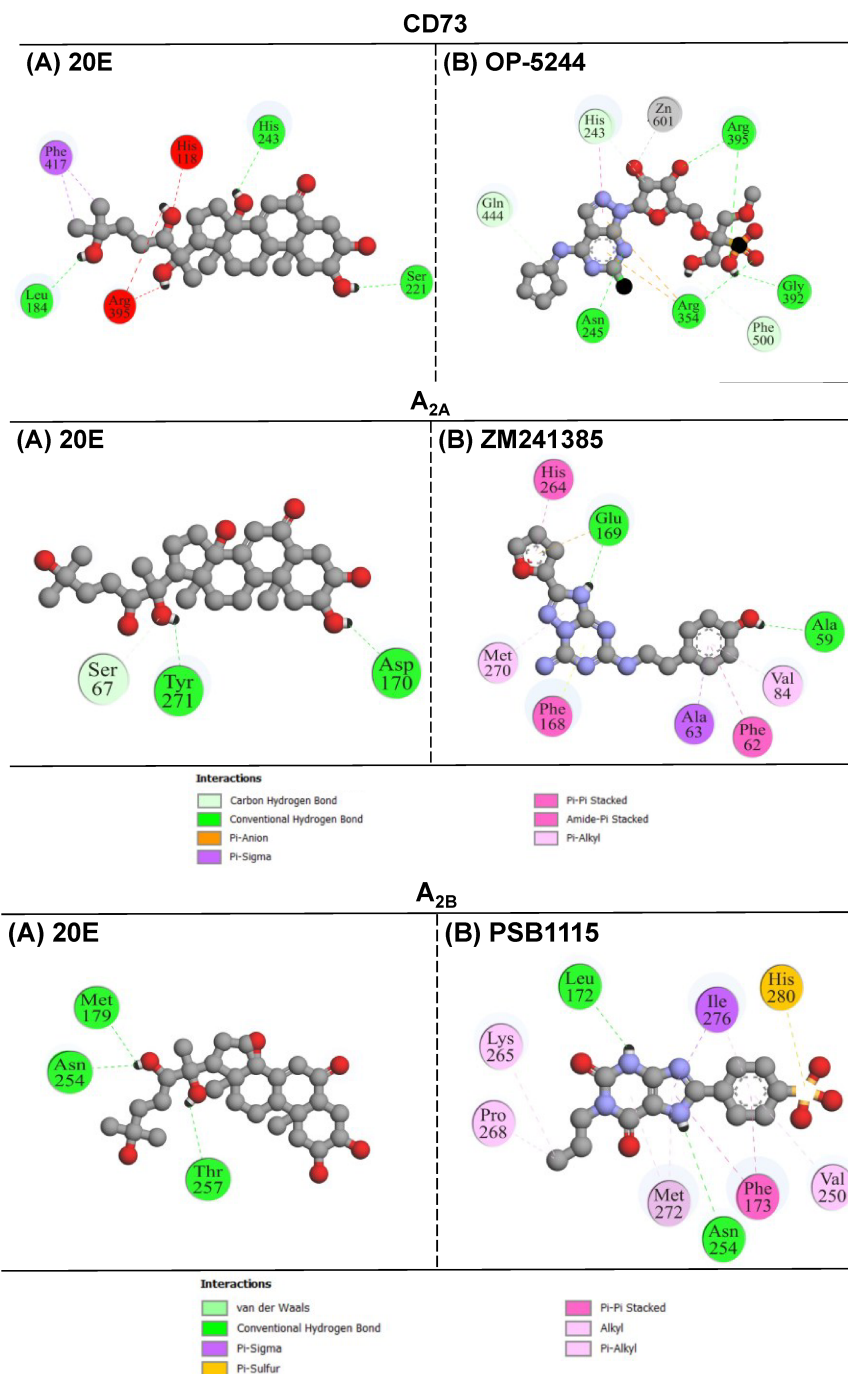


A Figura 5B confirma que a 20E ancora-se no sítio ortostérico do receptor A2A, compartilhando o mesmo bolsão ocupado pelos inibidores sintéticos. A ligeira vantagem numérica do ZMA ($-9,0$ kcal/mol) decorre da presença de anéis aromáticos planos em sua estrutura, os quais se acomodam favoravelmente entre as hélices do receptor. Em contrapartida, a 20E, por possuir um esqueleto esteroideal mais volumoso, ocupa a mesma cavidade com um arranjo estérico levemente expandido, mantendo uma energia de ligação expressiva ($-8,2$ kcal/mol).

A Figura 5C ilustra a base estrutural para a modesta diferença de afinidade observada no receptor A2B. Por apresentar um volume molecular substancial, a 20E adota uma orientação espacial ligeiramente deslocada na cavidade do receptor em comparação ao inibidor seletivo PSB1115 ($-7,6$ kcal/mol), o que limita sua inserção na porção mais profunda do bolsão. Com isso, partes do esqueleto do fitoecdisteroide interagem com resíduos mais periféricos, gerando uma pequena penalização no score energético.

Finalmente, o mapeamento 2D elucidou as bases moleculares das afinidades observadas (Figura 6). Na enzima CD73, o inibidor OP-5244 ($-9,0$ kcal/mol) estabelece um complexo perfil de interações na fenda catalítica, destacando-se a coordenação metálica direta com o íon Zn601 e uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Arg395, Asn245, Arg354 e Gly392. Por sua vez, a 20E obteve uma estabilidade termodinâmica ligeiramente superior, de $-9,2$ kcal/mol, ao compensar a ausência de interação com o zinco através de fortes ligações de hidrogênio convencionais com His243, Ser221 e Leu184, além de uma interação Pi-Sigma com a Phe417. O compartilhamento da interação com a His243 confirma que o 20E bloqueia o acesso à região farmacofórica chave da enzima, sobrepondo-se ao volume espacial do inibidor de referência (Bhattarai *et al.*, 2015; Knapp *et al.*, 2012).

Figure 6. Os diagramas ilustram os mapas de interação 2D correspondentes aos alvos CD73, A2A e A2B destacando as principais ligações de hidrogênio e os contatos hidrofóbicos com resíduos de aminoácidos cruciais. (A) Interação com Ecdisterona (20E). (B) Interação com inibidores descritos.



No receptor A_{2A}, a superioridade termodinâmica do controle ZMA (−9,0 kcal/mol) é fundamentada pela sua vasta rede de interações do tipo Pi (empilhamento Pi-Pi com Phe168 e His264, e interações Pi-Alquil com Met270 e Val84), favorecida pela inserção de seus anéis aromáticos na porção mais profunda e hidrofóbica do bolsão ortostérico. Em contraste, a 20E (−8,2 kcal/mol), devido à sua natureza alifática e esteroidal, adota um perfil de reconhecimento polar, estabilizando-se via ligações de hidrogênio com Tyr271 e Asp170. Esta transição de um padrão estritamente hidrofóbico para um ancoramento mais hidrofílico justifica a diferença

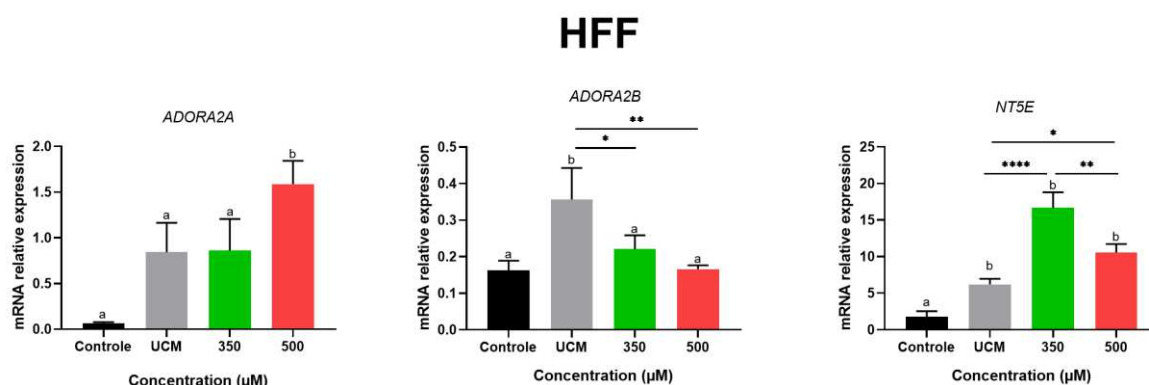
termodinâmica sem, contudo, comprometer a competitividade estrutural da 20E frente ao receptor (Lebon *et al.*, 2011).

Dinâmica semelhante foi observada no receptor A2B. O inibidor PSB1115 (−7,6 kcal/mol) projeta-se internamente via interações hidrofóbicas do tipo Pi-Sulfur e Pi-Alquil com resíduos como Phe173, Ile276 e His280. Em contrapartida, o 20E (−7,1 kcal/mol) posiciona-se de forma ligeiramente deslocada na matriz espacial do receptor, limitando seu acesso às sub-regiões mais profundas, o que reflete na leve queda de afinidade calculada. Contudo, é fundamental ressaltar que tanto o PSB1115 quanto a 20E compartilham uma ligação de hidrogênio vital com o resíduo Asn254. A conservação desta interação indica que o fitoecdisteroide atua como uma barreira física no vetor de entrada do sítio ativo, interpondo-se diretamente à sinalização adenosinérgica (Fernández *et al.*, 2009).

Efeitos da Ecdisterona sobre a expressão de componentes da sinalização purinérgica em fibroblastos tratados com meio condicionado

Considerando o potencial da 20E de se ligar a componentes da sinalização purinérgica, a expressão de seus transcritos foi quantificada por qPCR em células HFF tratadas com meio condicionado (Figura 7). Após tratamento com meio condicionado sem presença de 20E (UCM), foi verificado um aumento na expressão de *NT5E* e *ADORA2B* comparada ao controle. Comparando-se com UCM, apenas a expressão de *ADORA2B* e *NT5E* foi modulada. Em ambas as concentrações foram observados menores níveis de *ADORA2B* e maiores de *NT5E*. Para *ADORA2A*, foram identificados níveis maiores apenas na maior concentração e em comparação com fibroblastos não tratados.

Figura 7. Efeitos da Ecdisterona sobre a expressão de componentes da sinalização purinérgica em células HFF tratadas com meio condicionado. A expressão gênica foi determinada por RT-qPCR utilizando HPRT como gene constitutivo. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão, com n = 3 repetições. Os valores de p são representados por **** (p < 0,0001); ** (p < 0,01) e * (p < 0,05). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.



ADORA2A (Receptor de adenosina A2A); *ADORA2B* (Receptor de adenosina A2B); *NT5E* (Ecto-5' nucleotidase).

Discussão

A agressividade e o pior prognóstico do CMTN são amplamente descritos na literatura, sendo que a interação tumor-estroma em seu microambiente imunossupressor desempenha um papel fundamental na progressão da doença e na resistência terapêutica, impactando dramaticamente o desfecho clínico (Niture *et al.*, 2025). A existência e a reprogramação de células estromais, especialmente fibroblastos, no MT influenciam o metabolismo e o status imunológico, o que os torna alvos importantes para um tratamento efetivo (ZHANG *et al.*, 2024). De fato, CAFs têm sido atores-chave na evasão imunológica do CMTN (MENTUCCI *et al.*, 2025) e compreender quais vias de sinalização regulam sua ativação e manutenção é essencial no desenvolvimento de novos métodos de tratamento e na manutenção de sua eficácia.

Compostos naturais ativos apresentam múltiplas atividades, incluindo imunomoduladoras, associadas aos seus diferentes alvos e vias de transdução de sinal, o que os torna capazes de prevenir ou superar a resistência terapêutica (IZZO; STEFANSKA, 2025). A 20E é um hormônio encontrado em artrópodes e plantas (ARIF *et al.*, 2022), cujo potencial antitumoral já foi amplamente avaliado em linhagens de células de câncer cervical, hepatoma (MAMADALIEVA *et al.*, 2011), leucemia linfoblástica aguda (LING *et al.*, 2019), câncer de pulmão de células não pequenas (SHUVALOV *et al.* 2023) e câncer de mama (ROMANIUK-DRAPAŁA *et al.*, 2021). Em 2023, Shuvalov e colaboradores demonstraram sua ação antioxidante e de inibição da glicólise e do conteúdo de ATP, sugerindo, assim, o potencial da 20E em modular o equilíbrio de nucleotídeos. Assim, hipotetizamos, no presente estudo, que a 20E é capaz de atuar na sinalização purinérgica. Apresentamos, portanto, uma abordagem inédita, ao demonstrar os efeitos da 20E sobre enzimas e receptores purinérgicos em células de

CMTN e como seu meio condicionado modula o fenótipo de fibroblastos.

Para isso, foram utilizadas concentrações não citotóxicas da 20E. De fato, o potencial antitumoral de um composto não está associado apenas aos mecanismos de morte, o que ficou evidente na capacidade da 20E em inibir a migração, tanto horizontal quanto vertical, das células MDA-MB-231, sugerindo a ação desse composto em vias relacionadas à invasão e progressão. O meio condicionado das células de CMTN tratadas com Ecdisterona foi então coletado, e utilizado no tratamento de fibroblastos humanos, uma vez que a fenoconversão de fibroblastos normais da pele para CAFs já foi previamente descrita em células HFF tratadas com meio condicionado de células de câncer de ovário (FERRARESI *et al.*, 2024).

Interessantemente, o meio condicionado inibiu a migração horizontal dos fibroblastos, o que não aconteceu quando as células HFF foram tratadas diretamente com a 20E. Portanto, o secretoma das células de CMTN tratadas influenciou o comportamento dos fibroblastos, sugerindo o potencial da 20E em modular essas células estromais no MT.

Já foi descrito na literatura que os fatores secretados por células tumorais no meio condicionado incluem metabólitos, citocinas e fatores de crescimento, que se assemelham aos níveis presentes nos microambientes *in vivo*. Assim, o meio condicionado tem se mostrado um sistema experimental conveniente para estudar a interação tumor-estroma (ZHUANG *et al.*, 2018). Considerando que CAFs no MT superexpressam CD73 e que esta enzima se encontra diretamente relacionada à imunossupressão por aumentar os níveis de ADO (YU *et al.*, 2020), sugerimos que os efeitos aqui observados estejam relacionados a componentes da sinalização purinérgica.

Interessantemente, os dados de *docking* molecular evidenciaram que a 20E apresenta a complementaridade estérica e a estabilidade termodinâmica necessárias para competir de forma eficaz com a ADO e AMP em seus respectivos sítios de ligação, assim como os inibidores de referência. Ademais, a análise tridimensional atestou que a 20E não se liga de forma periférica ou inespecífica à superfície proteica, mas sim de maneira direcionada aos mesmos bolsões ativos alvo de fármacos oncológicos. Ao demonstrar capacidade preditiva para bloquear o eixo de sinalização imunossupressora no MT, este metabólito secundário se apresenta como um fitoquímico promissor enquanto modulador da sinalização purinérgica. Por esta razão, investigou-se se a 20E também seria capaz de modular a expressão de componentes da sinalização purinérgica nos fibroblastos tratados com meio condicionado. Após tratamento com meio condicionado sem a presença de 20E (UCM), os níveis de *NT5E* aumentaram. Como a predição *in silico* revelou o potencial de 20E de atuar sobre CD73, o aumento de seus transcritos após tratamento com meio condicionado com 20E pode revelar um feedback molecular, na

tentativa de restaurar sua possível inibição. Congruentemente, predizendo-se menores níveis de ADO, há um aumento de ADORA2A e menor expressão de ADORA2B, reforçando o eixo CD73-ADO-A2A, uma vez que, como já descrito, ADO extracelular exerce inibição imune preferencialmente por meio do receptor adenosinérgico A2A (YU *et al.*, 2020).

Esses resultados complementam os dados de *docking*, uma vez que a interação predita da 20E com CD73, A2B e A2B converge com a modulação dos níveis de seus transcritos. Embora a afinidade molecular predita e a expressão gênica representem fenômenos distintos, os achados fortalecem a hipótese de participação da sinalização purinérgica nos efeitos da 20E. Assim, essa modulação ocorre não apenas diretamente nas células de CMTN, mas também na comunicação parácrina estabelecida com os fibroblastos, podendo contribuir para as alterações de migração observadas neste estudo. No entanto, ainda são necessários estudos funcionais para determinar como as alterações transcricionais e as interações preditas interferem efetivamente na atividade da via purinérgica.

Conclusão

20E, em concentrações não citotóxicas, inibiu a migração horizontal e vertical de células de CMTN, enquanto o meio condicionado das células tratadas interferiu no comportamento migratório dos fibroblastos humanos. A abordagem computacional *in silico* demonstrou que 20E apresenta estabilidade termodinâmica e complementaridade espacial altamente favoráveis para atuar como um modulador da sinalização purinérgica. 20E ocupa efetivamente as regiões farmacofóricas críticas da enzima CD73 e dos receptores de adenosina A2A e A2B, superando as afinidades de ligação de seus ligantes endógenos AMP e ADO. Notavelmente, as robustas redes de ligações de hidrogênio formadas pela 20E, particularmente com resíduos essenciais como His243, Leu184 e Ser221 na CD73, Glu169 e Ala59 no receptor A2A e Leu172 e Asn254 no receptor A2B, mimetizam os mecanismos de bloqueio de inibidores já descritos. Congruentemente, 20E modulou diferencialmente a expressão dos genes codificantes de CD73, A2A e A2B. Esses achados sugerem que a 20E possui potencial como composto promissor para o desenvolvimento de novos agentes imunoterapêuticos, fornecendo uma base estrutural para antagonizar competitivamente o MT imunossupressor. Ademais, este estudo amplia a compreensão sobre os efeitos da 20E no CMTN e abre novas perspectivas para seu potencial na modulação da interação tumor-estroma.

Referências

- ALLARD, B.; TURCOTTE, M.; STAGG, J. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, art. 485156, 8 p., 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/485156>.
- ALLARD, B.; LONGHI, M. S.; ROBSON, S. C.; STAGG, J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. **Immunological Reviews**, v. 276, n. 1, p. 121–144, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12528>.
- ASLAN, V. *et al.* The responsiveness of breast cancer cells to varied levels of vitamin B12, cisplatin and G-CSF. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, art. 9086, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26189086>.
- BAR-HAI, N. *et al.* Modeling epithelial-mesenchymal transition in patient-derived breast cancer organoids. *Frontiers in Oncology*, v. 14, art. 1470379, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1470379>.
- BARNARD, M. E. *et al.* Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer**, v. 1856, n. 1, p. 73–85, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.002>.
- BASMAEIL, Y. *et al.* Conditions mimicking the cancer microenvironment modulate the functional outcome of human chorionic villus mesenchymal stem/stromal cells in vitro. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, art. 650125, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.650125>.
- BHATTARAI S. *et al.* α,β -Methylene-ADP (AOPCP) Derivatives and Analogues: Development of Potent and Selective ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Inhibitors. **J Med Chem.** 2015 Aug 13;58(15):6248-63. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00802>.
- BOISON, D.; YEGUTKIN, G. G. Adenosine metabolism: emerging concepts for cancer therapy. **Cancer Cell**, v. 36, n. 6, p. 582–596, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.10.007>.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- BROGNA, M. R. *et al.* The role of CAFs in therapeutic resistance in triple negative breast cancer: an emerging challenge. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 12, art. 1568865, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2025.1568865>.
- BUXTON, I. L. *et al.* Purinergic mechanisms in breast cancer support intravasation, extravasation and angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 291, n. 2, p. 131–141, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.09.021>.
- CAI, H., XU, Y., GUO, S. *et al.* Structures of adenosine receptor A_{2B}R bound to endogenous and synthetic agonists. **Cell Discov** 8, 140 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00503->

1

CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375-380, 1986. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90640-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90640-8).

CHEN, Z. *et al.* Classifications of triple-negative breast cancer: insights and current therapeutic approaches. **Cell & Bioscience**, v. 15, n. 59, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13578-025-01359-0>.

CHOI, H. S. *et al.* TAZ is involved in breast cancer cell migration via regulation of RhoA/ROCK-dependent cytoskeletal dynamics. **Frontiers in Oncology**, v. 14, 2024, art. 1376831. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1376831>.

COSTA, A. V. *et al.* Fungicidal Activity and In Silico Studies of Triazoles Derived From Glycerol Against *Neocosmospora falciformis*, A Causal Agent of Guava Tree Decline. **Chemistry & Biodiversity**, v. 23, n. 6, e71389, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.71389>.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. Version 2.0. Schrödinger, LLC, 2009.

Dassault Systèmes BIOVIA. **Discovery Studio Modeling Environment**, Release 2025, San Diego: Dassault Systèmes, 2025.

DESSIE, Z. G.; ZEWOTIR, T. Global determinants of breast cancer mortality: a comprehensive meta-analysis of clinical, demographic, and lifestyle risk factors. **BMC Public Health**, v. 25, art. 2640, 2025. DOI: [10.1186/s12889-025-24036-w](https://doi.org/10.1186/s12889-025-24036-w).

DOMÍNGUEZ-CEJUDO, M. A. *et al.* Targeting the tumor microenvironment in breast cancer: prognostic and predictive significance and therapeutic opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16771, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms242316771>.

DU, S. *et al.* The piR-31115-PIWIL4 complex promotes the migration of the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 by suppressing HSP90AA1 degradation. **Gene**, v. 942, 2025, 149255. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2025.149255>.

FERNÁNDEZ, FRANCO, et al. “1,3-Dialkyl-8-N-Substituted Benzyloxycarbonylamino-9-Deazaxanthines as Potent Adenosine Receptor Ligands: Design, Synthesis, Structure–Affinity and Structure–Selectivity Relationships.” **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 17, no. 10, May 2009, pp. 3618–29. Crossref, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.062>.

FERRARESI, A. *et al.* Ovarian Cancer Cell-Conditioning Medium Induces Cancer-Associated Fibroblast Phenocconversion through Glucose-Dependent Inhibition of Autophagy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 5691, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25115691>.

FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.

FORLI, S. *et al.* Computational protein–ligand docking and virtual screening with the AutoDock suite. **Nature Protocols**, v. 11, n. 5, p. 905–919, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>.

FOTSITZOUDIS, C. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts: The Origin, Biological Characteristics and Role in Cancer — A Glance on Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 14, n. 18, art. 4394, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14184394>.

GIMENES, S. N. C. *et al.* Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA(2) inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on *MDA-MB-231* breast cancer cell. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7077, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-07082-2.

HEVENER, K. E.; ZHAO, W.; ZIMMER, D. M.; BROOKS, W. H.; KELLOGG, G. E. Validation of molecular docking programs for virtual screening applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 444–460, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/ci800293n>.

HONG, O. Y. *et al.* Inhibition of cell invasion and migration by targeting matrix metalloproteinase-9 expression via sirtuin 6 silencing in human breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 12, art. 12125, 2022, art. 12245. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16405-x>.

HOPKINS, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 11, p. 682–690, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio.118>.

HURTADO, P. *et al.* Dangerous Liaisons: Circulating Tumor Cells (CTCs) and Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs). **Cancers**, v. 12, n. 10, art. 2861, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12102861>.

JAAKOLA, VELI-PEKKA *et al.*, The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A_{2A} Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. **Science** **322**, 1211–1217 (2008). DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1164772>.

JIA, W. *et al.* Purinergic signalling in cancer therapeutic resistance: from mechanisms to targeting strategies. **Drug Resistance Updates**, v. 70, art. 100988, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100988>.

KNAPP K, ZEBISCH M, PIPPEL J. **Crystal Structure of the Human Ecto-5'-Nucleotidase (CD73): Insights into the Regulation of Purinergic Signaling**. *Structure*, 2012; 20, 2161–2173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2012.10.001>.

KOUSSÉMOU, M.; KLOTZ, K.-N. Agonists activate different A_{2B} adenosine receptor signaling pathways in MBA-MD-231 breast cancer cells with distinct potencies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, p. 1515–1521, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01695-2>.

LAN, X. *et al.* Revisiting the role of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, 2025. DOI:

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1582532>.

LEBEDEVA, V. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer Unveiled: Bridging Science, Treatment Strategy, and Economic Aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 19, art. 9714, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26199714>.

LEBON G, WARNE T, EDWARDS PC, BENNETT K, LANGMEAD CJ, LESLIE AG, TATE CG. Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation. **Nature**. 2011 May 18;474(7352):521-5. doi: <https://doi.org/10.1038/nature10136>.

LING, T. *et al.* Cytostatic and Cytotoxic Natural Products against Cancer Cell Models. **Molecules**, v. 24, n. 10, art. 2012, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24102012>.

LOI, S. *et al.* Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 7, p. 860–867, mar. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902>.

MAMADALIEVA, N. R. *et al.* Phytoecdysteroids of *Silene guntensis* and their in vitro cytotoxic and antioxidant activity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 66c, p. 215–224, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2011-5-604>.

MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>.

MENTUCCI, F. M. *et al.* Interplay between cancer-associated fibroblasts and dendritic cells: implications for tumor immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 16, art. 1515390, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1515390>.

MIRIPOUR, Z. S. *et al.* The presence of cancer-associated fibroblast in breast cavity side margins is in correlation with the expression of oncoproteins by adjacent epithelial cells: a new era in cancerous potential. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-024-05943-8>.

NITURE, S. *et al.* Tumor Microenvironment Dynamics of Triple-Negative Breast Cancer Under Radiation Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 6, p. 2795, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26062795>.

O'BOYLE, N. M. *et al.* Open Babel: an open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 1, art. 33, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>.

ROMANIUK-DRAPAŁA, A. *et al.* Proapoptotic and proautophagic activity of 20-hydroxyecdysone in breast cancer cells in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, v. 342, p. 109479, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109479>.

ROSIGNOLI, S.; PAIARDINI, A. DockingPie: a consensus docking plugin for PyMOL. **Bioinformatics**, v. 38, n. 21, p. 4967–4969, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac452>

SANTIAGO, S. S. *et al.* Synthesis, antileishmanial activity, and in silico study of 2-hydroxy-3-(1,2,3-triazolyl)propyl vanillin derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 36, n. 5, e20240200, p. 1–21, 2025. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20240200>.

SHUVALOV, O. *et al.* One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 23955-23977, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15053>.

SHUVALOV, O. *et al.* 20-Hydroxyecdysone confers antioxidant and antineoplastic properties in human non-small cell lung cancer cells. **Metabolites**, v. 13, n. 5, art. 656, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo13050656>.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer Statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1–32, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>.

STEWART, J. J. P. MOPAC2016. Colorado Springs, CO: **Stewart Computational Chemistry**, 2016. Disponível em: <http://openmopac.net>.

TAMAJUSUKU, A. S. *et al.* Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 are increased by thyroid hormones in vascular smooth muscle cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 289, n. 1–2, p. 65-72, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-006-9148-0>.

TREDAN, O. *et al.* Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441–1454, out. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/99/19/1441/2544230?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 09 out. 2025.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

VULETIĆ, A. *et al.* The role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its therapeutic targeting. **Cells**, v. 14, n. 17, art. 1353, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells14171353>.

WANG, G. *et al.* Characterization of cancer-associated fibroblasts (CAFs) and development of a CAF-based risk model for triple-negative breast cancer. **Cancer Cell International**, v. 23, art. 294, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03152-w>.

WANG, H.; TURECHEK, W. W. Detection of *Viável Xanthomonas fragariae* Cells in Strawberry Using Propidium Monoazide and Long-Amplicon Quantitative PCR. **Plant**

Disease, v. 104, n. 4, p. 1105–1112, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2248-RE>.

WANG, X. *et al.* Spatial transcriptomics reveals substantial heterogeneity in triple-negative breast cancer with potential clinical implications. **Nature Communications**, v. 15, art. 10232, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54145-w>.

WARREN, G. L. *et al.* A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5912–5931, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm050362n>.

WILSON, B. E. *et al.* Breast cancer immune microenvironment: from pre-clinical models to clinical therapies. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 191, p. 257–267, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06431-0>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Classification of Tumours Editorial Board. **Breast Tumours**. 5. ed. Lyon: IARC Press, 2019. (WHO Classification of Tumours, v. 2).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Classification of Diseases for Oncology: ICD-O-3.2**. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/standards/classifications/other-classifications/international-classification-of-diseases-for-oncology>. Acesso em: 24 ago. 2025.

YANG, E. *et al.* Exosome-Mediated Metabolic Reprogramming: The Emerging Role in Tumor Microenvironment Remodeling and Its Influence on Cancer Progression. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 242, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00359-5>.

YIN, L. *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 61, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.

YU, M. *et al.* CD73 on cancer-associated fibroblasts enhanced by the A₂B-mediated feedforward circuit enforces an immune checkpoint. **Nature Communications**, v. 11, art. 515, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14060-x>.

ZAGAMI, P. *et al.* Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. **npj Breast Cancer**, v. 8, art. 95, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>.

ZANNETTI, A. Breast Cancer: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches 2.0. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2542, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24032542>.

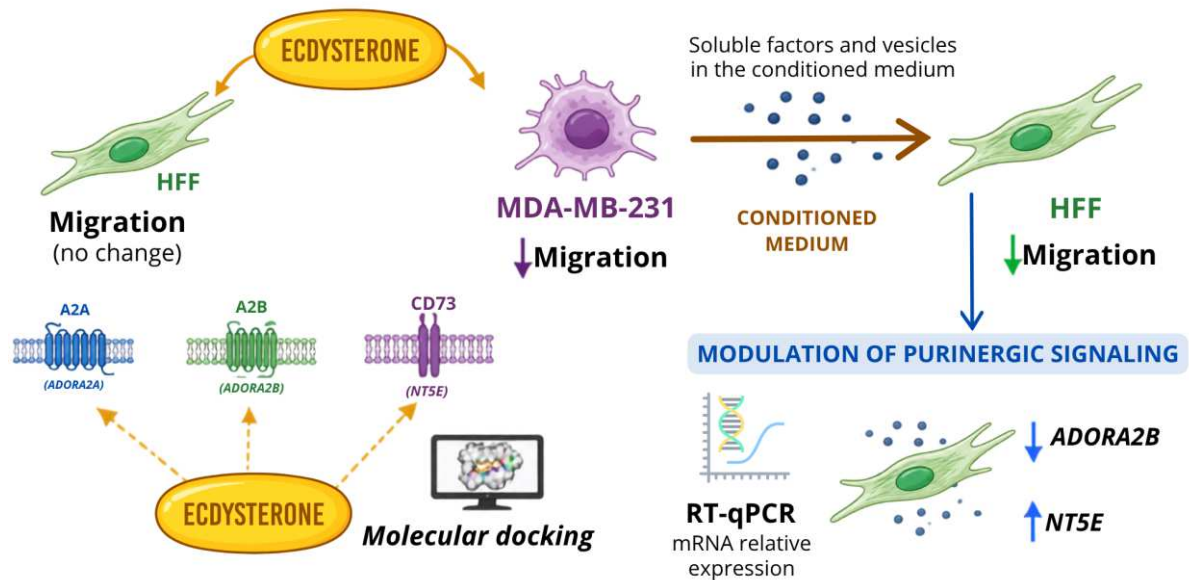
ZHANG, F. *et al.* Cancer-associated fibroblasts and metabolic reprogramming: unraveling the intricate crosstalk in tumor evolution. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 17, art. 80, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01600-2>.

ZHANG, M. *et al.* Extracellular matrix stiffness: mechanisms in tumor progression and therapeutic potential in cancer. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 14, p. 54, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40164-025-00647-2>.

ZHUANG, X. *et al.* Conditioned medium mimicking the tumor microenvironment augments chemotherapeutic resistance via ATM and NF- κ B pathways in gastric cancer cells. **Oncology Reports**, v. 40, n. 4, p. 2334-2342, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2018.6637>.

Graphical abstract

Representação esquemática dos efeitos da Ecdisterona (20E) sobre células de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e da influência de seu meio condicionado sobre fibroblastos humanos (HFF). Em concentrações não citotóxicas, a 20E reduziu a migração das células MDA-MB-231. O meio condicionado proveniente das células tumorais tratadas com 20E reduziu a migração dos fibroblastos e modulou componentes da sinalização purinérgica. Análises de *docking* molecular demonstraram o potencial de interação da 20E com CD73 e com os receptores de adenosina A2a e A2b. Nos fibroblastos expostos ao meio condicionado, a análise por RT-qPCR evidenciou redução de *ADORA2B* e aumento de *NT5E*, sugerindo a participação da sinalização purinérgica na modulação da comunicação tumor-estroma.

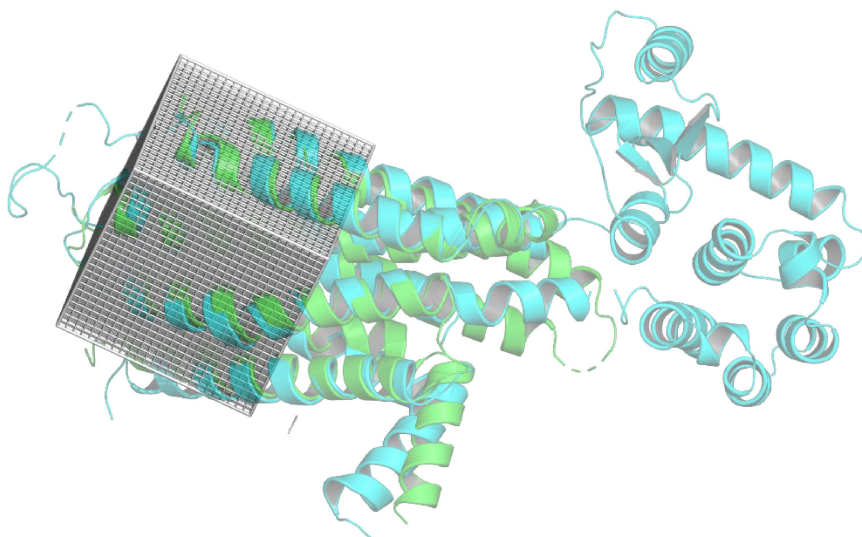


CONCLUSÃO

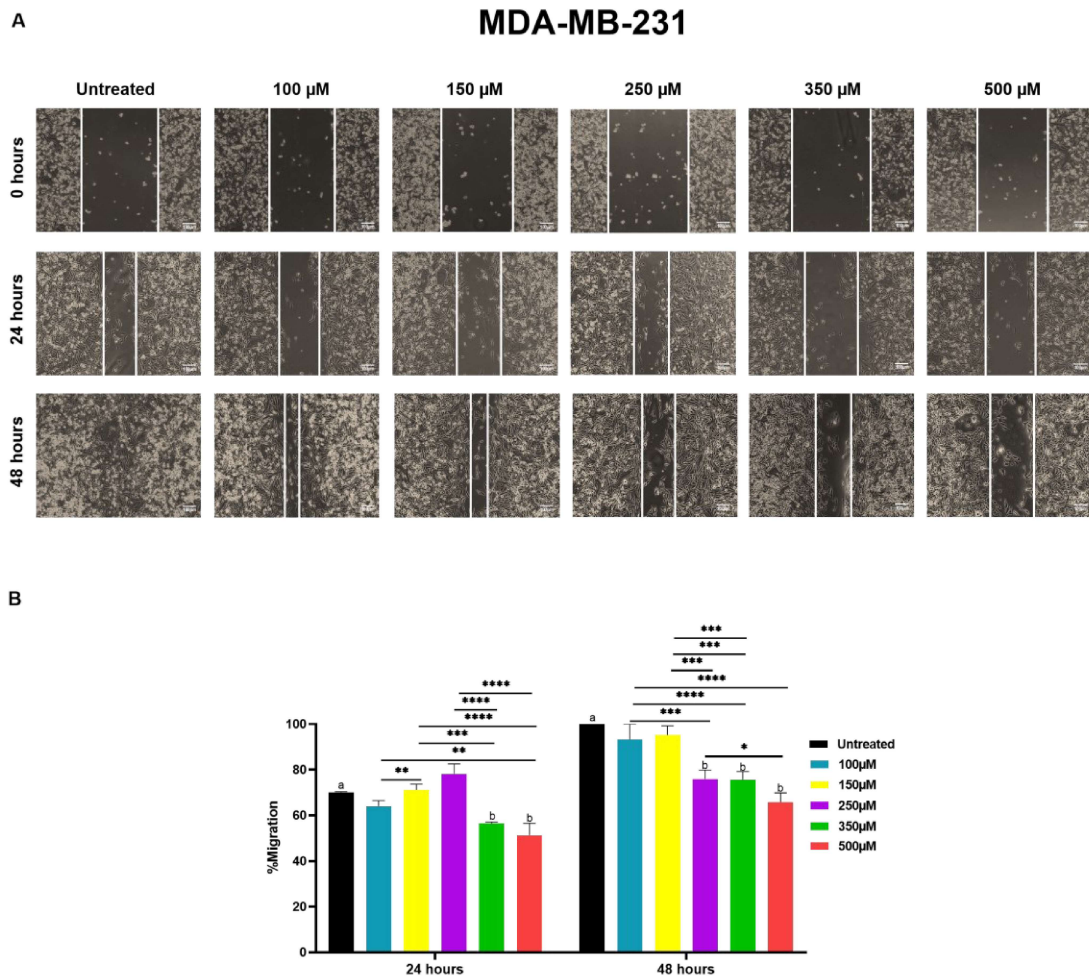
Os resultados deste estudo demonstraram que a Ecdisterona, em concentrações não citotóxicas, foi capaz de modular o comportamento de células de CMTN e influenciar fibroblastos humanos. A 20E reduziu a capacidade migratória das células MDA-MB-231, enquanto o meio condicionado proveniente dessas células tratadas interferiu na migração dos fibroblastos, evidenciando que seus efeitos não se restringem à ação direta sobre as células tumorais, mas também repercutem sobre células presentes em seu microambiente tumoral. A investigação da sinalização purinérgica permitiu estabelecer uma possível relação entre essa via e os efeitos observados. As análises *in silico* demonstraram o potencial da 20E de interagir com CD73 e com os receptores de adenosina A2A e A2B, enquanto o tratamento dos fibroblastos com o meio condicionado modulou a expressão de componentes dessa mesma via, especialmente *ADORA2B* e *NT5E*. Em conjunto, esses achados sugerem que a 20E pode interferir na interação tumor-estroma por mecanismos relacionados à sinalização purinérgica. Dessa forma, os achados obtidos ampliam a compreensão sobre a atuação da 20E no CMTN e abrem novas perspectivas para a investigação da sinalização purinérgica como alvo na modulação do microambiente tumoral.

APÊNDICE

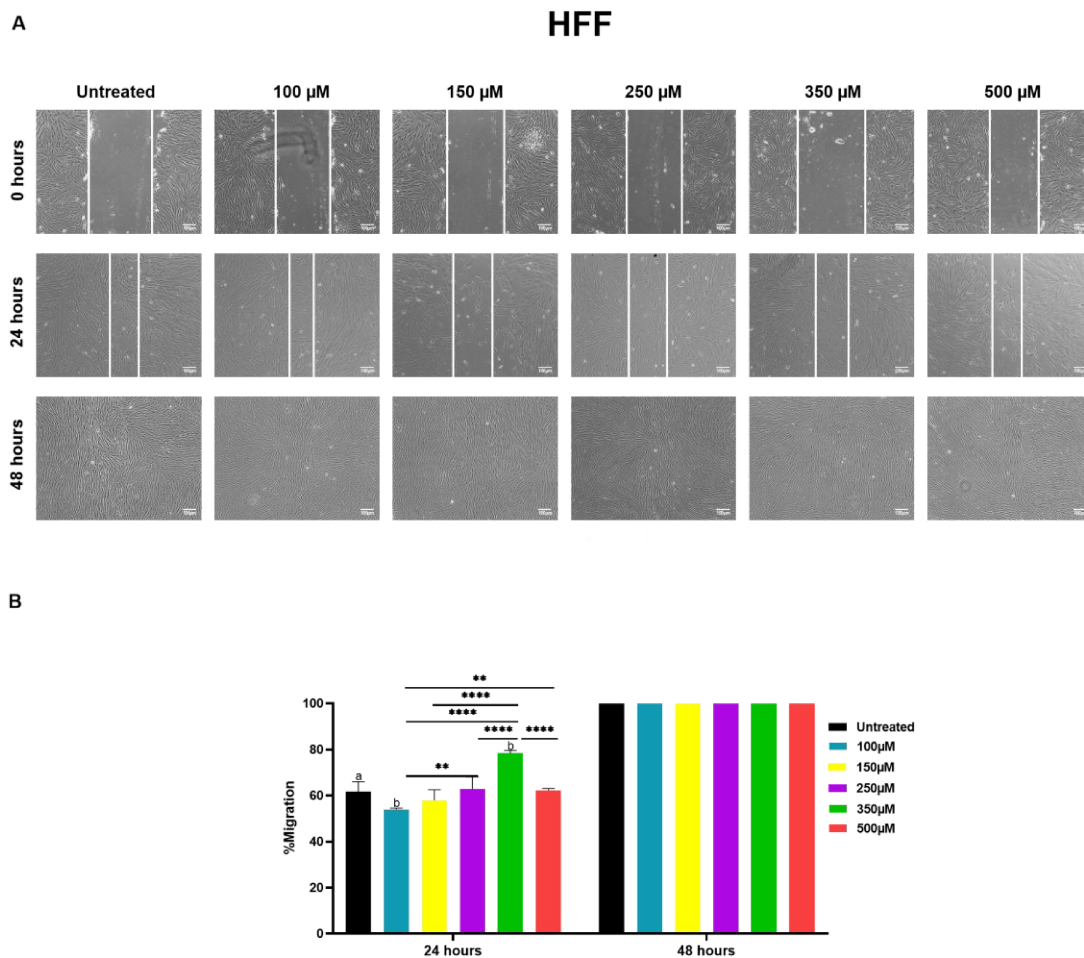
APÊNDICE A - Estruturas dos receptores 3EML (ciano) e 8HDP (verde) alinhadas estruturalmente no programa PyMOL. As coordenadas do *grid box* foram projetadas e visualizadas utilizando o *plugin* DockingPie 1.2.



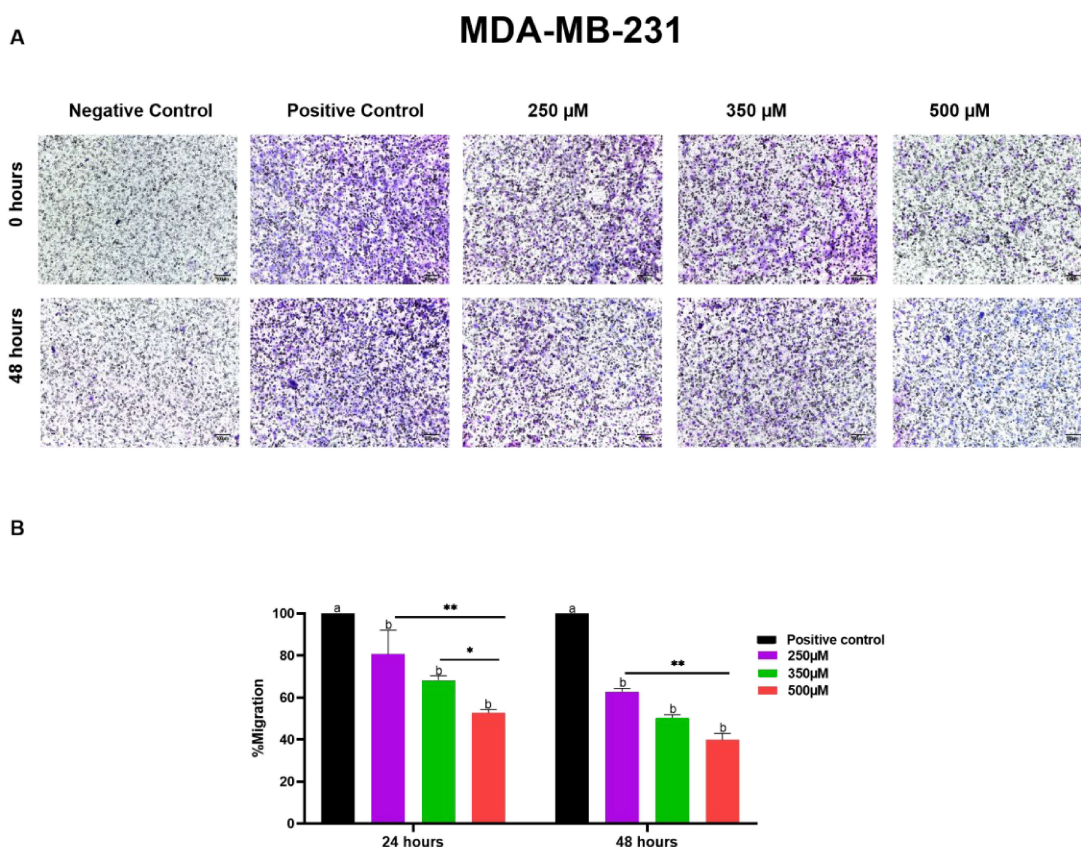
APÊNDICE B - Efeitos da Ecdisterona sobre a migração horizontal das células de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231). (A) Células MDA-MB-231 confluentes foram lesionadas e tratadas com Ecdisterona e a largura das ranhuras foi examinada após 0, 24 e 48 horas utilizando um microscópio óptico com aumento de 100x. (B) A representação quantitativa da inibição da migração. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n = 3$ repetições. Os valores de p são representados por **** ($p < 0,0001$), *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$) e * ($p < 0,05$). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.



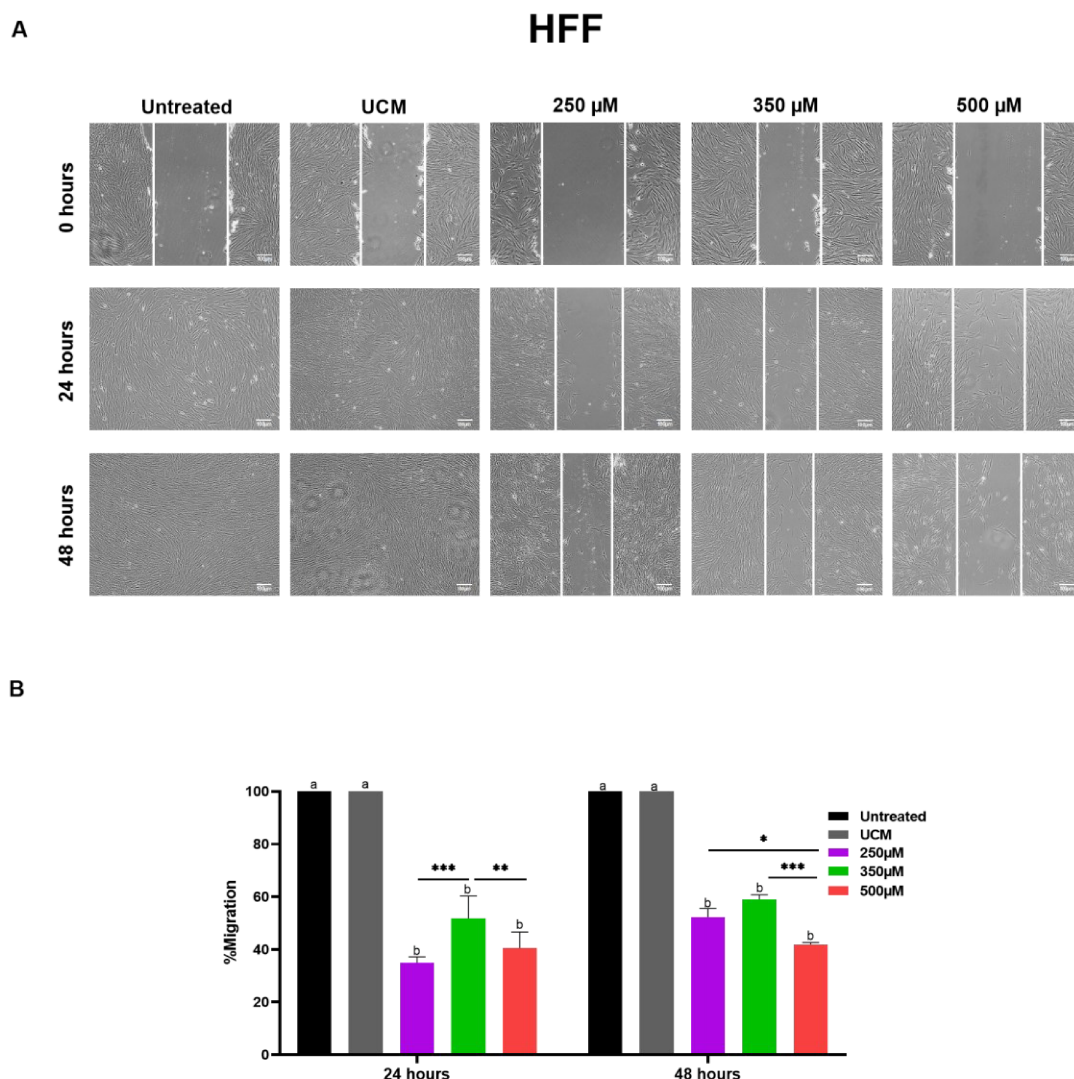
APÊNDICE C - Efeitos da Ecdisterona sobre a migração horizontal das células de fibroblastos. (A) Células HFF confluentes foram lesionadas e tratadas com Ecdisterona e a largura das ranhuras foi examinada após 0, 24 e 48 horas utilizando um microscópio óptico com aumento de 100x. (B) A representação quantitativa da inibição da migração. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n = 3$ repetições. Os valores de p são representados por **** ($p < 0,0001$) e ** ($p < 0,01$). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.



APÊNDICE D - Efeitos da Ecdisterona sobre a migração vertical das células de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231. (A) Fotografias microscópicas do ensaio Transwell realizado por 24 e 48 horas. (B) Representação gráfica da migração vertical. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n = 3$ repetições. Os valores de p são representados por ** ($p < 0,01$) e * ($p < 0,05$). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.

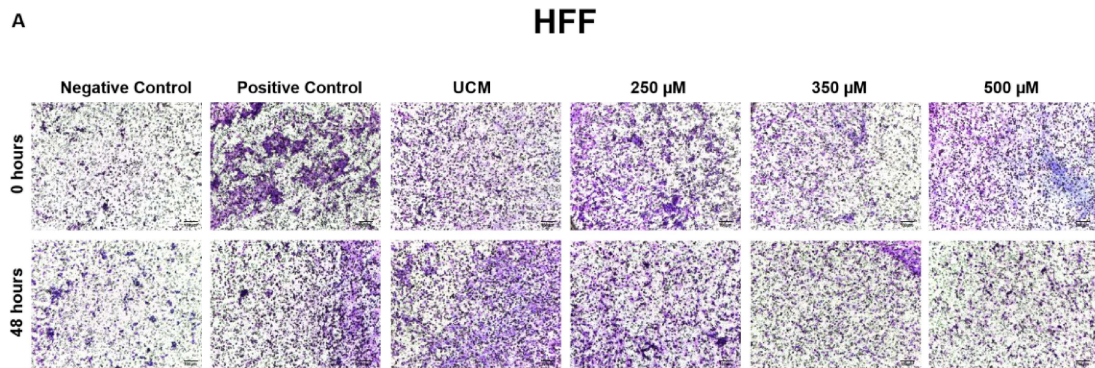


APÊNDICE E - Efeitos do meio condicionado de células de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231 tratadas com Ecdisterona sobre a migração horizontal de fibroblastos humanos. (A) Células HFF confluentes foram lesionadas e tratadas com meio condicionado e a largura das ranhuras foi examinada após 0, 24 e 48 horas utilizando um microscópio óptico com aumento de 100x. (B) A representação quantitativa da inibição da migração. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n = 3$ repetições. Os valores de p são representados por *** ($p < 0,001$); ** ($p < 0,01$) e * ($p < 0,05$). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.



APÊNDICE F - Efeitos do meio condicionado sobre a migração vertical de fibroblastos.

(A) Fotografias microscópicas do ensaio Transwell realizado por 24 e 48 horas. (B) Representação gráfica da migração vertical. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n = 3$ repetições. Os valores de p são representados por ** ($p < 0,01$). Tratamentos identificados com a letra “b” diferem estatisticamente do controle.



B

