

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

FERNANDA CARDOSO DA SILVA

**PERFIL DE EXPRESSÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES EM LINHAGENS
CELULARES DE MAMA E REGULAÇÃO POR miRNAs**

**PATOS DE MINAS
JULHO DE 2017**

FERNANDA CARDOSO DA SILVA

**PERFIL DE EXPRESSÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES EM LINHAGENS
CELULARES DE MAMA E REGULAÇÃO POR miRNAs**

Monografia apresentada ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Ribas Fürstenau

PATOS DE MINAS

JULHO DE 2017

FERNANDA CARDOSO DA SILVA

Perfil de expressão das ectonucleotidases em linhagens celulares de mama e regulação por miRNAs

Monografia apresentada ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Dra. Cristina Ribas Fürstenau - UFU
Presidente

Dra. Thaise Gonçalves de Araújo - UFU
Membro

Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa - UFU
Membro

Patos de Minas- MG, 24 de julho de 2017

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, pela saúde e pelas oportunidades que tive ao longo desses anos de aprender e amadurecer. Agradeço também por Ele ter colocado em minha vida pessoas maravilhosas que me auxiliaram ao longo dessa caminhada.

Algumas dessas pessoas, eu tive o prazer de conhecer desde o nascimento, que é a minha família. Agradeço aos meus pais, Belchior e Celina, que jamais mediram esforços para que eu pudesse conquistar meus sonhos e mesmo, muitas das vezes, não compreendendo o porquê de minhas escolhas, jamais deixaram de me apoiar. Agradeço também aos meus irmãos, Fabrício e Flávia, que sempre me auxiliarem no que necessitei. À minha tia Maria, que sempre cuidou de mim como uma mãe e que me esperou até mais tarde da noite para que eu não tivesse que chegar em casa sozinha.

Agradeço também aos meus amigos, tanto aqueles que conheci fora da Universidade quanto aqueles que a UFU me proporcionou, que foram essenciais para que eu pudesse concluir com êxito essa jornada. Em especial, agradeço à Isabella, Arthur e Andréia, pessoas espetaculares que estiveram ao meu lado desde antes da Universidade. À Janayne por ser uma excelente melhor amiga, excelente colega de estudo, melhor pessoa para se ter no grupo e a melhor pessoa para dividir uma coca-cola em um dia de prova. À Juliana e à Thamara, com quem passei a maior parte do tempo e com quem compartilhei os melhores e piores momentos. Ao Willian, meu companheiro de ônibus, pela amizade, apoio e por ser a única pessoa que entende o que quero dizer ao fim de um dia exaustivo.

À minha orientadora, Cristina Ribas Fürstenau, por, primeiramente, aceitar o encargo de me orientar e por ser uma pessoa incrível de uma doçura imensa. Agradeço por tudo o que fez por mim e por esse trabalho, pela paciência e carinho.

À Lorena e à Suelen, que me auxiliaram durante a Iniciação Científica e sem elas eu jamais teria conseguido concluí-la. À Christina Martins por ter me ensinado as metodologias da cultura de célula e por todo apoio e amizade. À Thaís Cunha, que disponibilizou tempo para me auxiliar na escolha das metodologias de bioinformática.

Ao Grupo de Pesquisa de Bioquímica Vascular por toda amizade e apoio.

À professora Thaíse e ao professor Aulus que se dispuseram a participar da banca de defesa e contribuírem para esse trabalho.

Aos professores e técnicos, pela dedicação, atenção e por todos os ensinamentos. Enfim, à Universidade Federal de Uberlândia e aos Órgãos fomentadores de pesquisa (CNPQ e FAPEMIG) pela oportunidade de aprendizado que me ofertaram.

RESUMO

O câncer de mama é um dos tipos de câncer de maior incidência e mortalidade, pois é uma doença heterogênea, isso dificulta o diagnóstico e tratamento específicos. As ectonucleotidases aparentemente estão relacionadas ao desenvolvimento tumoral, e o perfil de expressão dessas enzimas parece alterar quando se compara células tumorais e células normais, sugerindo que a expressão delas é regulada por algum mecanismo. Os miRNAs são moléculas pequenas de RNA que atuam se ligando a RNAm complementares e inibindo sua expressão, e podem realizar a regulação das ectonucleotidases em câncer de mama. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a participação das ectonucleotidases na capacidade invasiva e agressiva do câncer de mama em três linhagens de mama, uma controle (MCF 10) e duas tumorais (MCF-7 e MDA-MB231), com diferentes graus de malignidade; e ainda avaliar se existe regulação pós-transcricional dessas enzimas por miRNAs e identificá-los. Para isso, foram realizadas a análise da expressão gênica das ectonucleotidases NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase por *q-PCR*, análise *in silico* para busca de miRNAs e análises estatísticas. Os resultados apontam maior expressão de RNAm da NTPDase1 na linhagem MCF-7 e menor expressão da ecto-5'-nucleotidase na MCF-7. Foram identificados três miRNAs que têm como alvo a NTPDase1 (hsa-miR-9-5p, hsa-miR-331-3p e hsa-miR-346) e três que tem como alvo a ecto-5'-nucleotidase (hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-155-5p e hsa-miR-34a-5p). Conclui-se que a expressão dessas enzimas é diferente nas diferentes linhagens de mama estando associadas à agressividade; e ainda, existe uma regulação gênica mediada por miRNAs. Porém, são necessários estudos complementares para melhor compreensão.

Palavras-chave: Câncer de mama. Sinalização Purinérgica. Ectonucleotidases. Câncer. miRNAs.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the types of cancer of higher incidence and mortality, since it is a heterogeneous disease, that makes specific diagnosis and treatment difficult. The ectonucleotidases apparently are related to tumor development, and the expression profile of these enzymes appears to change when comparing tumor cells and normal cells, suggesting that the expression of them is regulated by some mechanism. The miRNAs are small molecules of RNA that act by binding to complementary mRNAs and inhibiting their expression, and can effect the regulation of ectonucleotidases in breast cancer. The aim of the present study was to investigate the role of ectonucleotidases in the invasive and aggressive capacity of breast cancer in three breast, one control (MCF 10) and two tumor (MCF-7 and MDA-MB231) with different degrees of malignancy; and to evaluate if there is post-transcriptional regulation of these enzymes by miRNAs and to identify them. For this, the analysis of the gene expression of the ectonucleotidases NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase was performed by q-PCR, in silico analysis to search for miRNAs and statistical analyzes. The results indicate higher expression of NTPDase1 mRNA in the MCF-7 line and lower expression of the ecto-5'-nucleotidase in MCF-7. Three miRNAs were identified that targeting NTPDase 1 (hsa-miR-9-5p, hsa-miR-331-3p and hsa-miR-346) and three targeting the ecto-5'-nucleotidase (hsa-miR -30a-5p, hsa-miR-155-5p and hsa-miR-34a-5p). It is concluded that the expression of these enzymes is different in the different breast lines and being associated with aggressiveness; and, there is a gene regulation mediated by miRNAs. However, complementary studies are needed for a better understanding.

Key words: Breast cancer. Purinergic Signaling. Ectonucleotidases. Cancer. miRNAs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: adenosina desaminase
 Ado: adenosina
 ADP: adenosina-5'-difosfato
 AGO2: Argonauta 2
 ALPs: alcalino-fosfatases
 AMP: adenosina-5'-monofosfato
 AP3B1: Complexo de proteína AP3 com subunidade β 1
 ATP: adenosina-5'-trifosfato
 β 2M: Beta-2 microglobulina
 BRCA1: Breast cancer 1
 BRCA2: Breast cancer 2
 BRMS1: Supressor de metástase de câncer de mama 1
 CM: câncer de mama
 CALJA: calcificação das articulações e das artérias
 CCNG1: Ciclina G1
 CD39: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
 CD73 e NT5E: ecto-5'-nucleotidase
 DNA: ácido desoxirribonucleico
 Doc: Docetaxel
 EBV: vírus Epstein-Barr
 ECs: células endoteliais
 ELK3: Fator de transcrição ETS
 E-NPPs: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases
 E-NTPDase 1, NTPDase 1 ou ENTPD1: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases 1
 GPI: glicosilfosfatidilinositol
 HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
 HNSCC: carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
 ING5: Inibidor do crescimento membro da família 5
 LARP1: Membro da família do domínio da ribonucleoproteína 1
 miRNAs: Micro-RNAs
 MTHFD2: Metilenotetrahidrofolato desidrogenase (NADP + dependente) 2
 MTHFD1L: Metilenotetrahidrofolato desidrogenase (NADP + dependente) semelhante à 1
 NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo
 NMN-nucleosídeo: Nicotinamida nucleotídeo adenililtransferase
 NOTCH1: Notch homólogo 1
 NPP ou E-NPP: nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase ou ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase
 NTPDase ou E-NTPDase: nucleosídeo 5'-trifosfato difosfohidrolase ou ecto- nucleosídeo 5'-trifosfato difosfohidrolase
 Nts: nucleotídeos
 oncomiRNA: miRNA oncogênico
 P1: receptor adenosinérgico
 P2X: receptor purinérgico ionotrópico
 P2Y: receptor purinérgico metabotrópico
 p53: proteína 53
 PCPH: Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 5
 PHLPP: Proteína fosfatase rica em repetições leucina e domínios PH

PPi: fosfato inorgânico
pre-miRNA: Micro-RNA precursor
pri-miRNA: Micro-RNA primário
PTEN: Homólogo de fosfatase e tensina
RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAm: RNA mensageiro
RPKM: Reads Per Kilobase Million (Milhões de quilobases por leituras)
SRCIN 1: Inibidor de sinalização de quinase SRC 1
SRPK1: Proteína Quinase 1 de domínio rico em serina e arginina
TRAMP: adenocarcinoma transgênico da próstata de ratos
UDP: uridina difosfato
UDP-glicose: uridina difosfato glicose
UTP: uridina trifosfato
ZNF652: Proteína de “dedo de zinco” 652

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Gráfico representando os níveis relativos de RNAm da NTPDase1: (***: $p < 0,001$).	14
Figura 2 Gráfico representando os níveis relativos de RNAm da ecto-5'-nucleotidase em três linhagens de mama (MCF-10, MCF-7 e MDA-MB231): (***: $p < 0.001$; *: $p < 0.05$).	16
Figura 3 Gráfico representando os níveis relativos de RNAm da ecto-5'-nucleotidase e da NTPDase1 por linhagem celular de mama (MCF-10, MCF-7 e MDA-MB231): (****: $p < 0,0001$; *: $p < 0,05$).	17
Figura 4 Dados da ferramenta GTEx de expressão do RNAm da NTPDase1.	19
Figura 5 Dados da ferramenta GTEx de expressão do RNAm da ecto-5'-nucleotidase.	21
Figura 6 Diagrama de Venn demonstrando os resultados obtidos para a identificação dos miRNAs e mostrando a quantidade de miRNAs identificados em mais de um software que tem como alvo a NTPDase1.	26
Figura 7 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-9-5p.	27
Figura 8 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-331-3p.	29
Figura 9 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-346.	30
Figura 10 miRNAs selecionados que possuem como alvo o RNAm da NTPDase1 e o local onde se ligam ao alvo promovendo a degradação ou não tradução do gene.	31
Figura 11 Diagrama de Venn demonstrando os resultados obtidos para a identificação dos miRNAs e mostrando a quantidade de miRNAs identificados em mais de um software que tem como alvo o mRNA da ecto-5'-nucleotidase.	32
Figura 12 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-30a-5p.	33
Figura 13 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-155-5p.	33
Figura 14 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-34a-5p.	35
Figura 15 miRNAs selecionados que possuem como alvo o RNAm da ecto-5'-nucleotidase, e o local onde se ligam ao alvo promovendo a degradação ou não tradução do gene.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência dos primers usados os ensaios de qPCR dos genes NTPDase1 (ENTPD1) e ecto-5'-nucleotidase (NT5E).....	12
Tabela 2 miRNAs identificados pelo software miRTarBase que possuem relação como o desenvolvimento do câncer de mama.	22
Tabela 3 miRNAs identificados pelo software miRTarBase que possuem como alvo a NTPDase1.....	23
Tabela 4 miRNAs identificados pelo software miRTarBase que possuem como alvo a ecto-5'-nucleotidase.....	23
Tabela 5 miRNAs identificados pelo software TargetScanHuman 7.1 que possuem como alvo a NTPDase1.	23
Tabela 6 miRNAs identificados pelo software TargetScanHuman 7.1 que possuem como alvo a ecto-5'-nucleotidase.	24
Tabela 7 miRNAs identificados pela ferramenta microT-CDS do software DIANA TOOLS que possuem como alvo a NTPDase1.	24
Tabela 8 miRNAs identificados pela ferramenta TarBase v7.0 do software DIANA TOOLS que possuem como alvo a NTPDase1.	25
Tabela 9 miRNAs identificados pela ferramenta microT-CDS do software DIANA TOOLS que possuem como alvo a ecto-5'-nucleotidase.	25
Tabela 10 miRNAs identificados pela ferramenta TarBase v7.0 do software DIANA TOOLS que possuem como alvo a ecto-5'-nucleotidase.	25
Tabela 11 Resultados dos três softwares para o alvo NTPDase1.....	26
Tabela 12 Resultados dos três softwares para o alvo ecto-5'-nucleotidase.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
	Objetivos.....	2
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1	Câncer de mama	2
2.2	Sinalização purinérgica.....	3
2.3	Ectonucleotidasas.....	5
2.4	Regulação da expressão gênica.....	6
2.5	miRNAs e a regulação gênica	7
2.6	Sinalização purinérgica e câncer.....	8
2.7	Sinalização purinérgica e câncer de mama	10
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1	Cultura de células	11
3.2	Análise da Expressão Gênica por <i>q-PCR</i>	12
3.3	Análises estatísticas	12
3.4	Análises de expressão gênica <i>in silico</i>	12
3.5	Busca <i>in silico</i> de miRNAs	13
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1	Análise da Expressão Gênica por <i>q-PCR</i>	13
4.2	Análises de expressão gênica <i>in silico</i>	18
4.3	Busca <i>in silico</i> de miRNAs	21
4.3.1	Ferramentas do software <i>miRTarBase</i>	22
4.3.2	Software <i>TargetScanHuman</i> 7.1.....	23
4.3.3	Ferramentas do software <i>DIANA TOOLS</i>	24
4.3.4	Análise dos resultados de todos os softwares	26
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um dos tipos de câncer que mais afeta mulheres em todo o mundo. O diagnóstico precoce é necessário para que se tenha um tratamento eficiente. Além disso, é essencial compreender o tipo específico de câncer, pois cada um apresenta comportamento e resposta peculiar quando submetidos a determinado tratamento (INCA, 2014).

A sinalização purinérgica está presente em diversos organismos e em distintos sistemas biológicos, realizando papel fundamental em inúmeros processos fisiopatológicos, incluindo o câncer. As ectonucleotidases são enzimas envolvidas nessa sinalização e estão sendo apontadas como essenciais para o desenvolvimento e resistência dos tumores (BERGAMIN et al., 2012), e o grau de expressão dessas enzimas em tumores é apontado como fator que altera a malignidade e invasividade das células cancerígenas. Adicionalmente, a regulação pós transcricional dos RNAm das ectonucleotidases pode ser realizada por micro-RNAs (miRNAs). Dessa forma, a resposta ao tratamento para o câncer pode estar intimamente ligada também à desbalanços na sinalização purinérgica.

Os miRNAs são moléculas pequenas de RNA endógenos de 21-25 nucleotídeos (nts) de comprimento e são potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (WAHID et al., 2010). Os miRNAs atuam ligando-se ao RNAm e ocasionando a clivagem ou não tradução do mesmo, acarretando na redução dos níveis proteicos de seus genes-alvo (FILHO; KIMURA, 2006).

Estudos já são realizados para investigar a ação dos miRNAs na regulação da sinalização purinérgica. Assim, são conhecidas famílias de miRNAs que regulam a expressão de receptores purinérgicos e ectonucleotidases (FERRARI et al., 2016). Ainda, já é vista a necessidade de se relacionar essas moléculas com o desenvolvimento e malignidade do câncer (FILHO; KIMURA, 2006).

Considerando o exposto, acredita-se que essas enzimas determinem se haverá ou não a resposta imune tumoral, a qual é essencial no tratamento contra o tumor (STAGG et al., 2012). Portanto, tem-se a hipótese de que o perfil de expressão das ectonucleotidases esteja associado ao desenvolvimento e agressividade do câncer de mama.

Portanto, faz-se necessário elucidar a ação das ectonucleotidases no crescimento e na metástase associada ao câncer de mama, visto que podem ser utilizadas no diagnóstico, uma vez que é possível identificar peculiaridades referentes à um tipo específico de neoplasia mamária pela identificação da ectonucleotidase e da sua atividade. Além disso, essas enzimas

podem ser alvo de tratamentos com quimioterápicos ou anticorpos monoclonais visando aumentar ou reduzir sua atividade de acordo com o tipo de câncer de mama considerado.

Objetivos

Objetivo Geral

Investigar a expressão das ectonucleotidases em diferentes linhagens celulares de mama e seus mecanismos de regulação gênica mediado por miRNAs

Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão gênica das enzimas NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase por *qPCR* nas linhagens celulares humanas de mama MCF-10 (linhagem celular mamária não tumoral), MCF-7 (linhagem celular mamária tumoral) e MDA-MB231 (linhagem celular mamária tumoral);
- Identificar possíveis miRNAs envolvidos na regulação pós-transcricional das enzimas NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase por meio de ferramentas de bioinformática.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é uma doença heterogênea quanto à morfologia e à clínica, que resulta da proliferação desordenada das células mamárias ocasionando a formação do tumor, podendo acometer tanto homens quanto mulheres, sendo mais frequente nas mulheres (INCA, 2014). Esse tipo de câncer pode atingir qualquer pessoa em qualquer faixa etária, mas existem alguns fatores de risco que aumentam as chances de seu aparecimento, tais como sedentarismo, exposição frequente à radiação, histórico familiar de CM, alterações hereditárias nos genes *Breast cancer 1* (BRCA1) ou *Breast cancer 2* (BRCA2) e apresentar tecido mamário denso (PUBMED HEALTH, 2016).

O CM aparece como um dos mais frequentes e de maior mortalidade entre as mulheres em todo o mundo. Isso acontece mesmo em países desenvolvidos, que possuem maiores recursos e tecnologias para diagnóstico e tratamento, visto que a redução da mortalidade associada à esse tipo de câncer é insignificante diante do número total de casos (GIRIANELLI;

GAMARRA; SILVA, 2014). No Brasil, são esperados, aproximadamente, 58.000 novos casos de CM em 2016 e 2017. Este é o tipo de câncer mais frequente, depois do câncer de pele não melanoma, entre pacientes do sexo feminino nas regiões brasileiras Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, e o segundo mais frequente na Região Norte (INCA, 2015b).

Com o desenvolvimento tecnológico, a partir de 1950 houve uma expectativa de se alterar esse quadro referente à mortalidade associada ao CM. A descoberta da mamografia, e de formas de diagnóstico associadas à essa tecnologia, facilitou a detecção do CM e seu tratamento. É necessário, entretanto, que o câncer seja detectado nos estágios iniciais de desenvolvimento para se ter uma taxa de sobrevivência maior. Por isso, os países têm investido em campanhas que incentivam mulheres a partir de 40 anos de idade a realizarem a mamografia anualmente (TEIXEIRA, 2015).

Existem vários tipos de CM e um único tumor pode ser a combinação de diversos tipos, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento específicos. O tipo mais comum de CM é o carcinoma ductal, que tem início nas células dos ductos; e o tipo mais raro é o CM inflamatório, no qual a mama apresenta-se quente, avermelhada e inchada. Existe, ainda, o carcinoma lobular, que começa nos lobos ou lóbulos e é encontrado mais frequentemente em ambas as mamas do que os demais tipos (PUBMED HEALTH, 2016).

O diagnóstico do CM pode ser feito pelo autoexame; e por métodos que permitem um diagnóstico mais específico, como a tomossíntese mamária. Assim, as técnicas de diagnóstico mais empregadas são o autoexame, a mamografia, a ressonância nuclear magnética e a ultrassonografia (INCA, 2015a). Atualmente, há a preocupação em se desenvolver novas técnicas de diagnóstico que permitam a identificação específica do tipo de câncer, como por exemplo, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais que se liguem a proteínas específicas presentes em determinado tipo de CM (ARAÚJO et al., 2014a).

O tratamento para cada tipo de câncer vai depender da fase ou estágio em que a doença se encontra. Existem diferentes tipos de tratamento disponíveis para pacientes com CM, sendo alguns padrões, já utilizados, e outros em fase de teste. Os tratamentos padrão incluem a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a hormônio terapia e a terapia-alvo (PUBMED HEALTH, 2016).

2.2 Sinalização purinérgica

Em 1929, a hipótese de que o ATP, até então conhecido apenas como a “moeda” energética das células, estaria envolvido em sinalizações extracelulares começa a ser avaliada.

Naquele ano, Drury e Szent-Györgyi observaram que quando injetavam em cobaias, por via intravenosa, um extrato simples obtido do músculo cardíaco e de outros tecidos, ocorria a perturbação do ritmo cardíaco. Ao isolarem a substância perceberam que era a adenosina (Ado) que estava envolvida nessa sinalização (DRURY; SZENT-GYORGYI, 1929). Entretanto, apenas em 1972, deu-se o surgimento do termo sinalização purinérgica.

Durante muito tempo, a teoria do ATP como sinalizador foi criticada em função do seu bem estabelecido papel como fornecedor de energia para os mais distintos processos metabólicos (BURNSTOCK, 2014). Atualmente, entretanto, sabe-se que a sinalização purinérgica está envolvida em diversas vias metabólicas, tanto em estados patológicos quanto em estados normais. Sabe-se também que esse tipo de sinalização é essencial para a embriogênese, organogênese, desenvolvimento pós-natal e envelhecimento em vertebrados e está inteiramente envolvida em diversas doenças, como cardiopatias, inflamações e câncer, além de participar no desencadeamento da resposta imunológica (BURNSTOCK, 2015a; BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014; BURNSTOCK; DALE, 2015; BURNSTOCK; PELLEG, 2015).

Assim como todos os processos de sinalização celular, a sinalização purinérgica possui três componentes essenciais: 1) o efetor ou transmissor da sinalização; 2) o receptor específico para as moléculas transmissoras do sinal; e 3) mecanismo de inativação do sinal, que, nesse caso, é desempenhado por enzimas responsáveis por hidrolisar essas moléculas e cessar a sinalização (FENG et al., 2014).

Os efetores do sistema purinérgico são as purinas (ATP, ADP, UTP, UDP e Ado), que, além de estarem envolvidas nos processos intracelulares, podem também ser liberadas para o meio extracelular em resposta a eventos de natureza fisiológica ou patológica, para, então, realizarem a sinalização. São apontados inúmeros mecanismos de liberação de ATP, como a liberação por exocitose, canais na membrana, apoptose celular e necrose (CAPPELLARI et al., 2012a).

A ação precisa desses nucleotídeos ou nucleosídeos extracelulares é determinada por receptores, denominados receptores purinérgicos, que estão distribuídos em diferentes densidades na membrana plasmática de todos os tipos celulares. Os receptores purinérgicos podem ser divididos em duas grandes subclasses: receptores purinérgicos do tipo I (P1) e receptores purinérgicos do tipo II (P2). Os receptores metabotrópicos do tipo P1 são responsivos apenas à Ado e são categorizados como A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Já os receptores P2 são responsivos ao ATP e a outros nucleosídeos tri e difosfatos (ADP, UTP e UDP). Os receptores do tipo P2 se subdividem em ionotrópicos (P2X), canais iônicos responsivos exclusivamente ao ATP e,

entre os quais, são reconhecidos sete subtipos; e em receptores metabotrópicos (P2Y), que têm o ATP, ADP, UTP, UDP e uridina difosfato glicose (UDP-glicose) como ligantes e que se classificam em oito subtipos (BURNSTOCK, 2014; FENG et al., 2014). Além disso, já se tem relatos da presença desses receptores no interior da célula, em mitocôndria e em lisossomos, mas não se sabe ao certo a sua funcionalidade (BURNSTOCK, 2015b).

A resposta desencadeada pela ação dos efetores nos receptores purinérgicos irá depender do tipo celular que está recebendo a sinalização. A sinalização purinérgica é modulada por uma classe de enzimas eficientes denominadas ectonucleotidases (CAPPELLARI et al., 2012a).

2.3 Ectonucleotidases

As ectonucleotidases são ectoenzimas localizadas na superfície das células que são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares (JIANG et al., 2014).

Essas enzimas podem ser subdivididas em quatro famílias, como segue: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs), ecto-5'-nucleotidase, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) e alcalino-fosfatases (ALPs); sendo que diferem entre si quanto ao tipo de substrato que catalisam, bem como com relação a algumas propriedades bioquímicas e velocidades de reação (BERGAMIN et al., 2012).

As E-NTPDases, também conhecidas por CD39, possuem a capacidade de converter o trifosfato de adenosina (ATP) e o difosfato de adenosina (ADP) em adenosina monofosfato (AMP) (BAO et al., 2016). Foram identificados oito membros para essa família de enzimas em seres humanos (E-NTPDase1-8), das quais quatro delas, E-NTPDases1, 2, 3, e 8 são expressas na membrana plasmática. As demais, E-NTPDases4, 5, 6 e 7 são localizadas no meio intracelular, porém com o sítio ativo voltado para o citosol ou para o lúmen de organelas subcelulares. Essas enzimas estão envolvidas principalmente na mediação da inflamação em doenças, como por exemplo, doenças pulmonares agudas, nefropatia diabética e doença inflamatória intestinal (JIANG et al., 2014).

A família E-NPP é constituída por sete diferentes ectoenzimas (E-NPP1-7), mas apenas as E-NPP1, 2 e 3 estão envolvidas na sinalização purinérgica, podendo hidrolisar uma diversidade de substratos fosfatados, sendo mais frequentes o ATP e o ADP (CAPPELLARI et al., 2012a). As ecto-5'-nucleotidases, também denominadas CD73, são amplamente distribuídas, estão ligadas à membrana plasmática, exercem função não enzimática por participarem da interação célula-célula e célula-matriz e nas vias de sinalização intracelulares (CAPPELLARI et al., 2012a). Sua função enzimática de interesse é a de desfosforilar o AMP

em Ado. Além disso, as ecto-5'-nucleotidases estão associadas à inibição da inflamação e à redução da mortalidade causada pela sepse (BAO et al., 2016).

As ALPs possuem a capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de substratos, incluindo ATP, ADP, AMP e fosfato inorgânico (PPi), mas hidrolisam principalmente AMP, participando do metabolismo extracelular de nucleotídeos como produtoras de Ado. Esse grupo de enzimas é composto por quatro enzimas amplamente distribuídas no corpo humano (CAPPELLARI et al., 2012a). Portanto, as ectonucleotidases agem como um componente essencial de regulação da sinalização purinérgica, uma vez que ao hidrolisar as purinas extracelulares, essas enzimas mantêm o gradiente de ATP intra e extracelular e, assim, controlam rigidamente as respostas desencadeadas pela sinalização (FENG et al., 2014).

2.4 Regulação da expressão gênica

Todas as células possuem o conteúdo de DNA idêntico, porém, apenas uma pequena parte dos genes é traduzida em proteínas; e células diferentes, com diferentes morfologias e funções, apresentam expressões gênicas diferentes. Isso sugere que a expressão gênica em cada tipo celular sofra regulação de forma que alguns genes são expressos e outros silenciados. Além disso, sabe-se que os genes não são expressos de forma constante e imutável, mas são regulados de acordo com os estímulos ambientais (IGARASHI, 2015).

Existem três tipos principais de regulação da expressão gênica: regulação transcricional, regulação pós-transcricional e regulação pós-traducional. A regulação transcricional, como o próprio nome sugere, regula a transcrição dos genes em RNAs mensageiros (RNAm) e pode ocorrer por diferentes mecanismos. Um deles é a formação da cromatina, que é a formação do complexo proteína-DNA, no qual o DNA enrola-se em proteínas denominadas histonas, formando nucleossomos, e originando a cromatina. Nesse caso, só serão transcritos os genes que se encontram disponíveis, ou seja, em regiões que não possuam nucleossomos ou histonas impedindo a transcrição. Alguns mecanismos podem ocasionar a remodelação da cromatina, como a acetilação e desacetilação das histonas e metilação dos resíduos de desoxicitidina no DNA. Além da remodelação da cromatina, outros processos de regulação podem ocorrer, em nível-pré transcricional, como a ligação de fatores de transcrição e mecanismos epigenéticos (WEIL et al., 2017).

A regulação pós-transcricional é composta pelos mecanismos que atuam no RNAm transcrito, alterando sua estrutura, como splicing alternativo, inserção de *cap* e poliadenilação, impedindo seu transporte para o citoplasma, onde é traduzido em proteína; ou causando sua

degradação. Os miRNAs podem realizar o segundo mecanismo. Já a regulação pós-traducional consiste em alterações na proteína traduzida, que pode causar mudanças em sua estrutura, e consequentemente, em suas funções, tais como fosforilação, ubiquitinação e adição de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (IGARASHI, 2015).

2.5 miRNAs e a regulação gênica

Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs que possuem entre 21-25 nts de comprimento e desempenham um importante papel regulador gênico tanto em animais quanto em plantas, marcando RNAs específicos para a degradação ou a repressão da tradução. Sua importância é bastante reconhecida, visto que diversos ensaios clínicos e pré-clínicos para tratamento e diagnóstico de diferentes doenças, incluindo o câncer, já são realizados com base em estudos que têm como foco os miRNAs (WAHID et al, 2010).

Desde a transcrição até a etapa de atuação do miRNA, existe uma série de eventos que ocorrem com essa molécula. Inicialmente, o miRNA é transcrito pelas enzimas RNA polimerase II e III, gerando um pri-miRNA, que possui de 70-110 nts e apresenta um formato de grampo (MOULATLET, 2013). Seguindo a via de biogênese convencional (existem outras vias alternativas), o miRNA imaturo sofrerá dois processos de clivagem, um no núcleo da célula e outro no citoplasma (MACFARLANE; MURPHY, 2010). No núcleo da célula, o pri-miRNA é processado por uma endonuclease, Drosha, e uma helicase, produzindo o miRNA precursor (pre-miRNA), que será exportado ativamente para o citoplasma por meio do complexo exportin-5/RanGTP. Já no citoplasma, o miRNA é processado por uma RNA polimerase III, a DICER, e a dupla fita é desfeita por uma helicase, produzindo, assim, o miRNA-maduro (MOULATLET, 2013).

A ação dos miRNAs é realizada por meio da formação do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (MACFARLANE; MURPHY, 2010). O microRNA maduro se reúne à RISC, ativando o complexo, que se liga à região 3' não traduzida de RNAs mensageiros, graças à complementariedade de bases nitrogenadas, podendo ocasionar a clivagem do RNA ou repressão da tradução. Este mecanismo de atuação ocasionará a redução dos níveis proteicos de seus genes-alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (FILHO; KIMURA, 2006).

O grau e a natureza da complementaridade das bases entre o miRNA e o seu RNA alvo irão determinar o mecanismo de silenciamento de genes que irá ocorrer, podendo ser de dois tipos: degradação do RNA por clivagem e a inibição da tradução independente da

clivagem do alvo (MACFARLANE; MURPHY, 2010). Nos animais é raro encontrar um miRNA que seja exatamente complementar a seu alvo, mas, ainda assim, o miRNA consegue se ligar ao alvo e impedir que ocorra a tradução, por um mecanismo diferente da clivagem, ou seja, dificulta a passagem do ribossomo durante a tradução, fazendo com que sejam produzidas proteínas incompletas e não funcionais (MOULATLET, 2013). Existe a necessidade de se conhecer de forma detalhada as vias do miRNA para que seja possível a compreensão do seu papel fisiológico e das implicações associadas à disfunção e à desregulação na biossíntese ou atuação desses reguladores (MACFARLANE; MURPHY, 2010).

Em mamíferos, essas moléculas são associadas à regulação da apoptose, diferenciação, proliferação, hematopoese (FILHO; KIMURA, 2006), em doenças metabólicas, como obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes (DEL CARMEN MARTÍNEZ-JIMÉNEZ; MÉNDEZ-MANCILLA; PORTALES-PÉREZ, 2017). Além disso, já se tem relatos do envolvimento dos miRNAs com o câncer (DEL CARMEN MARTÍNEZ-JIMÉNEZ; MÉNDEZ-MANCILLA; PORTALES-PÉREZ, 2017) e na regulação da expressão de ectonucleotidases e de receptores purinérgicos (FERRARI et al, 2016).

Portanto, é relevante compreender os mecanismos de atuação dos miRNAs para que seja possível a identificação de quais miRNAs representam alvos terapêuticos e que podem ser usados para a produção de drogas ou biomarcadores em diversas doenças, incluindo o CM (DEL CARMEN MARTÍNEZ-JIMÉNEZ; MÉNDEZ-MANCILLA; PORTALES-PÉREZ, 2017).

2.6 Sinalização purinérgica e câncer

A sinalização purinérgica está envolvida em diversas desordens fisiopatológicas, sendo uma delas o câncer. Em 1980, houve a comprovação da relação existente entre a sinalização purinérgica e o câncer. Naquele ano, foi mostrado que a administração de ATP exógeno inibiu o crescimento de células de câncer do pâncreas e do cólon, evidenciando o potencial anti-neoplásico do ATP. A partir de então, inúmeros pesquisadores têm buscado compreender a sinalização purinérgica relacionada a cada tipo de câncer (JIANG; RIQUELME; ZHOU, 2015).

Além da administração de ATP exógeno, a liberação de ATP durante a necrose causada pela radioterapia, também possui potencial anti-neoplásico. O ATP liberado tem a capacidade de auxiliar no tratamento do câncer, devido ao fato de que estimulam a migração de monócitos e a quimiotaxise, estimulando a resposta imune tumoral (HENNEL et al., 2014).

Ao longo de estudos, foi sendo observado, no entanto, que nem sempre a administração de ATP inibia o crescimento dos tumores. Ao contrário, esse nucleotídeo tinha efeitos pró-tumorigênicos, sendo evidenciado, principalmente, em câncer de próstata e de mama (JIANG; RIQUELME; ZHOU, 2015). Jiang, Riquelme e Zhou (2015) justificam que a Ado tem efeito pró-tumorigênico. Logo, o excesso de ATP extracelular é convertido pelas ectonucleotidases em Ado, a qual, por sua vez, é responsável pela sinalização que estimula o crescimento e a metástase do câncer. A Ado tem essa capacidade de aumentar a agressividade do tumor por ser uma molécula supressora da resposta imune. E como, a infiltração de células do sistema imune na região do câncer é uma forma de diminuir o crescimento e a agressividade do mesmo, no entanto, a Ado inibe o processo de resposta imune tumoral (DUSHYANTHEN et al., 2015; GHIRINGHELLI et al., 2012). Ainda, Ferrari, Malavasi e Antonioli (2016) afirmam que os nucleotídeos e os nucleosídeos devem ser considerados como a nova classe de fatores prometastáticos, pois quando são liberados por células tumorais ou tecidos circundantes, atuam favorecendo a migração de células tumorais e a colonização de outros tecidos, culminando na metástase.

Alguns pesquisadores se dedicam a identificar os principais receptores purinérgicos envolvidos no desenvolvimento de tumores, pois dependendo do receptor específico ativado, as purinas extracelulares podem mediar imunossupressão ou imunoestimulação tumoral; e provocar a estimulação do crescimento ou citotoxicidade contra o tumor (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017). Visto isso, a Indústria Pharma está envolvida no desenvolvimento de medicamentos e testes clínicos de direcionamento seletivo a diferentes subtipos de receptores P1 de nucleosídeos e P2 de nucleotídeos, pois já se tem conhecimento de que os receptores P2 são expressos por todos os tumores e, em alguns casos, em um nível muito elevado (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013). Ainda, Wei et al. (2013) demonstrou que o bloqueio de receptores do tipo A_{2B} de Ado inibe o crescimento de células cancerígenas da próstata, sugerindo assim que antagonistas seletivos para A_{2B} possuem potencial para serem usados como novas terapias.

Além da Ado e do ATP, existem estudos voltados para as ectonucleotidases, que podem ter sua expressão aumentada ou diminuída em determinados tipos de câncer, sendo que muitos tumores exibem alterações nas enzimas que metabolizam o ATP, o que pode contribuir para os eventos patológicos observados no câncer (BERGAMIN et al., 2012). Um exemplo é a ecto-5'-nucleotidase (CD73) que está envolvida na promoção da fuga imune no câncer, por contribuir com a degradação do ATP extracelular liberado com a morte de células tumorais até Ado em tumores hipóxicos ou após a quimioterapia. Isso foi comprovado quando se analisou

que a deficiência de CD73 também suprimiu a tumorigênese da próstata em ratos com adenocarcinoma transgênico da próstata (TRAMP) (STAGG et al., 2012).

A E-NTPDase5 se difere dos outros membros da família por ser a única também caracterizada como um proto-oncogene, conhecida como nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 5 (PCPH). A superexpressão desse proto-oncogene, bem como a do PCPH mutado, aumenta a resistência celular ao estresse e à apoptose e; por essa razão, propõe-se a utilização dessa enzima para o diagnóstico (BRACCO; BERTONI; WINK, 2014). Villar et al. (2007) demonstrou que o nível de expressão e/ou o estado mutacional do PCPH contribui para determinar a capacidade de invasão células de câncer de próstata.

Cappellari et al. (2012b), em seus experimentos, avaliou a ação da Ado e da ecto-5'-nucleotidase na adesão das células de glioblastoma e demonstrou que havia uma superexpressão de Ado e da ecto-5'-nucleotidase neste tipo de câncer. Em tal estudo, a Ado induziu um aumento da adesão, ocasionando o crescimento do tumor. Com isso, os autores também demonstraram que a ação da ecto-5'-nucleotidase, importante produtora de Ado extracelular, pode modular o desenvolvimento de glioblastomas. Além disso, existem estudos voltados para a análise de qual ectonucleotidase está mais presente em determinado tipo de câncer. No câncer de bexiga, observou-se que houve uma diminuição da expressão de E-NTPDase3 e um aumento da expressão da CD73, a qual foi apontada como um biomarcador para o câncer de bexiga (ROCKENBACH et al., 2014).

2.7 Sinalização purinérgica e câncer de mama

A sinalização purinérgica envolvida no CM tem se apresentado como um tema promissor no entendimento do desenvolvimento, progresso e tratamento dessa patologia, ainda pouco explorado pelos pesquisadores. Já se sabe que as linhagens celulares de CM com maior potencial metastático, como a linhagem MDA-MB-231, liberam significativamente mais ATP e possuem maior número de receptor do tipo P2Y₂ do que as linhagens com menor potencial de metástase, como as linhagens MCF-7 e células epiteliais ou endoteliais normais (ECs) sob condições normais ou de hipóxia (EUN et al., 2015).

No CM, o ATP também foi apontado como sinalizador que pode inibir ou promover o crescimento do tumor, dependendo da concentração em que está presente. Zhou et al. (2015) observou que o ATP inibia a migração de células de CM humano em linhagens MDA-MB-231 através da ativação de receptores purinérgicos P2X nas células do tumor; porém, isso só ocorria na administração de baixas doses de ATP (aproximadamente 50 µM), enquanto que doses

maiores promoviam a migração (a partir de 200 μ M). Quando se bloqueou o receptor de Ado ou as ecto-ATPases, o efeito estimulador sobre a migração foi também bloqueado, demonstrando, assim, que a Ado promove a migração de células de CM.

A Ado estimula a metástase em CM pelo mecanismo receptor dependente. Já, através de um mecanismo independente de receptor, essa molécula pode inibir a invasão de células, sendo que quando se administra concentrações baixas de Ado, os nucleotídeos extracelulares e a Ado são rapidamente metabolizados na superfície de células tumorais pelas enzimas ecto-5'-nucleotidase e Ado desaminase (ADA) e são absorvidos pela célula e interconvertidos em ADP e ATP (VIRTANEN et al., 2014).

Quanto à presença de ectonucleotidases nesse tipo de câncer, existem poucas pesquisas. As mais relatadas são E-NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase. Tem-se conhecimento de que a presença de CD73 está associada ao mau prognóstico do câncer de mama triplo negativo, ou seja, negativo para receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e receptores de estrogênio e progesterona, e, ainda, que a sua superexpressão está relacionada à menor taxa de resposta e de desaparecimento do tumor invasivo pelo tratamento com antraciclina, pois a expressão de CD73 suprime funções anti-tumorais dos linfócitos T CD8⁺ (LOI et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

As linhagens celulares utilizadas para os ensaios foram: MCF-10 (não tumorigênica), MCF-7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231(fenótipo triplo negativo). As três linhagens foram mantidas em garrafas de cultura, sendo a MCF-10 cultivada em meio DMEM-F12 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 μ L de fator de crescimento epidérmico (EGF), 25 μ L de hidrocortisona, 50 μ L de Insulina e 50 μ L de antibiótico gentamicina. As linhagens MCF-7 e MDA-MB231 foram cultivadas em meio IMDM (Cultilab) suplementados com 10% de soro fetal bovino e 50 μ g/L de antibiótico gentamicina. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado em dias alternados até que as mesmas atingissem 80% de confluência para posterior utilização nos experimentos.

3.2 Análise da Expressão Gênica por *q*-PCR

Os RNAs totais das células foram extraídos com o auxílio do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo recomendações do fabricante. Para a obtenção do cDNA por transcrição reversa foram empregados 1 µg de RNA, utilizando-se o kit *SuperScript* II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Cada alíquota de 2 µl de cDNA foi amplificado com 5 pmol de cada iniciador específico (“primer”) (Tabela 1) para os genes em estudo (NTPDase1 e ecto-5’-nucleotidase). A *q*PCR em tempo real foi realizada com a utilização de 5 µL da mistura SYBR Green PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em um termociclador (*StepOne Plus*, Thermo Scientific, EUA). As amostras foram corridas em seis repetições e os dados foram normalizados com a Beta-2 microglobulina (β2M) como gene de referência, sendo a sequência de primers usados iguais aos descritos por Araújo et al. (2014b). E utilizou-se o método CT comparativo.

Tabela 1 Sequência dos primers usados os ensaios de qPCR dos genes NTPDase1 (ENTPD1) e ecto-5’-nucleotidase (NT5E).

Primer	Gene	Sequência	Tamanho do amplificado
1	ENTPD1 (forward)	5’ TGTGGTGGAGAGGAGCCTCA 3’	142pb
2	ENTPD1 (reverse)	5’ GCTGAACCACCTTGTTTCTGAC 3’	
3	NT5E (forward)	5’ CTCATCGCTCAGAAAGTGAGGG 3’	86 pb
4	NT5E (reverse)	5’ TTGGAAGGTGGATTGCCTGT 3’	

3.3 Análises estatísticas

Foram calculadas as médias e os desvios padrões para cada uma das medidas realizadas. O número amostral (n) representou o número de experimentos realizados com diferentes culturas das linhagens celulares de mama. O teste t não pareado foi utilizado para a comparação entre os grupos. As diferenças entre as amostras foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentar $p < 0.05$. Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 6.00 para Windows, como ferramenta computacional.

3.4 Análises de expressão gênica *in silico*

Fez-se a busca do gene das enzimas estudadas (NTPDase1 e ecto-5’-nucleotidase) no site *UCSC Genome Browser* (<<https://genome.ucsc.edu/>>), utilizando-se a ferramenta *Gene*

Sorter que permite encontrar genes semelhantes por expressão e outras métricas. Além disso, essa ferramenta apresenta informações sobre os genes e sua expressão em diferentes tecidos.

3.5 Busca in silico de miRNAs

Para encontrar e descrever potenciais miRNAs que têm, possivelmente, como alvo o RNAm dos genes NTPDase1 e ecto5'nucleotidase utilizou-se os softwares *TargetScanHuman* 7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/), *DIANA TOOLS* (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/index>) e *miRTarBase* (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>).

O software *TargetScanHuman* 7.1 permite a identificação de miRNAs que têm como alvo os genes de interesse, sendo esses miRNAs classificados de acordo com o escore e com o grau de conservação no homem; e ainda, redireciona para o software *miRBase*, onde se tem informações sobre o miRNA. Já o software *DIANA TOOLS* também permite a identificação dos miRNAs que atuam nos genes de interesse (ecto-5'-nucleotidase e NTPDase1), porém oferecendo outras informações. Foram usadas duas ferramentas desse software: a primeira foi a “microT-CDS”, que também organiza os miRNAs por escore e ainda oferece informação de que foi ou não verificado experimentalmente. A segunda ferramenta foi a “TarBase v7.0”, que organiza os miRNAs por experimento de validação de sua atuação com o alvo. Por fim, o *miRTarBase* permite a identificação dos miRNAs que atuam nos genes de interesse, organizando-os por experimentos de validação. Além disso, permite a identificação de miRNAs que estão envolvidos em processos fisiológicos e patológicos, como o câncer de mama. E ainda, tem informações sobre cada um dos miRNAs.

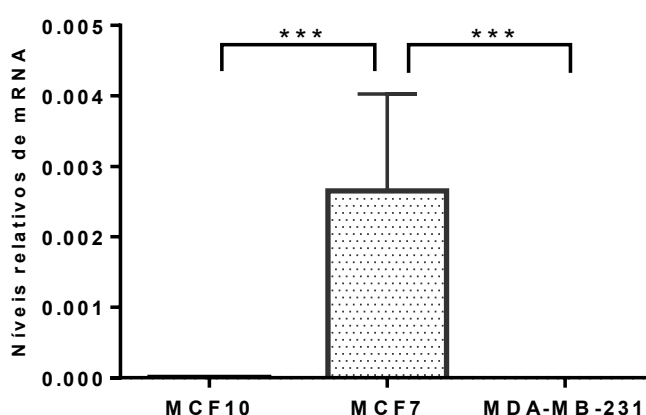
Foram selecionados três miRNAs que tem como alvo o RNAm da NTPDase1 e três miRNAs que tem como alvo a ecto-5'-nucleotidase. Os critérios de seleção para os miRNAs foram serem identificados por mais de um software e ser identificado pelo software *miRTarBase* como envolvido com o câncer de mama.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da Expressão Gênica por q-PCR

Os níveis relativos de RNAm da NTPDase1 foram maiores na linhagem MCF-7 (fenótipo luminal, tumor menos agressivo) e não houve identificação da expressão desse RNAm nas linhagens MCF-10 (não tumoral) e MDA-MB231 (fenótipo triplo negativo, tumor mais agressivo) (Figura 1). Como não foi observada expressão da NTPDase1 em MCF-10 e em MDA-MB231, houve diferença significativa entre as amostras das linhagens MCF-10 e MCF-7 ($p<0,001$), e entre as amostras das linhagens MCF-7 e MDA-MB231 ($p<0,001$) (Figura 1).

Figura 1 Gráfico representando os níveis relativos de RNAm da NTPDase1: (***: $p<0,001$).



Fonte: Autoria própria

Estudos demonstram que a NTPDase1 tem taxas significativamente mais altas de expressão proteica nos tecidos tumorais quando comparado com tecidos não tumorais, como observado em câncer gástrico (CAI et al., 2015), carcinoma hepatocelular (CAI et al., 2016), células epiteliais malignas, metástases hepáticas, gânglios linfáticos, adenocarcinoma retal metastático (ZHANG et al., 2015), leucemia linfocítica crônica de células B (ABOUSAMRA et al., 2015) e câncer de pulmão (SCHIMID et al., 2015). O mesmo foi observado nos níveis relativos de RNAm obtido em nossos resultados, sendo que, na linhagem celular tumoral (MCF-7) observou-se maior expressão de RNAm quando comparado com a expressão na linhagem não tumoral (MCF-10).

A NTPDase1 é descrita como a enzima que desempenha um papel dominante na regulação purinérgica da inflamação e na resposta imune porque sua expressão é influenciada por fatores genéticos e ambientais e porque, de uma forma indireta, ela regula a ecto-5'-nucleotidase, disponibilizando ou não o substrato (AMP), e regulando as concentrações de Ado extracelular (TAKENAKA; ROBSON; QUINTANA, 2016).

Além disso, a superexpressão da NTPDase 1 é associada ao aumento da recorrência do tumor, redução da sobrevida geral (CAI et al., 2016), estágios avançados da doença (ABOUSAMRA et al., 2015) e aumento da invasividade tumoral e da metástase (SCHIMID et al, 2015).

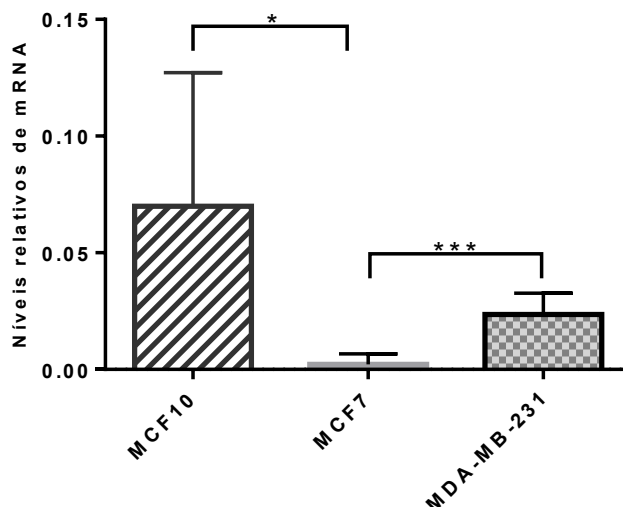
Porém, Zhang et al. (2015) obteve resultados de que a alta expressão dessa enzima está relacionada a um prognóstico favorável, enquanto que a baixa expressão da NTPDase 1 e alta expressão de ecto-5'-nucleotidase estão relacionadas à um mau prognóstico. Isso também corrobora com nossos resultados, pois a linhagem celular MCF-7 que possui um fenótipo menos agressivo expressou mais RNAm do que a linhagem MDA-MB231 que apresenta um fenótipo mais agressivo.

Além disso, resultados diferentes dos já apresentados foram encontrados para gliomas, sendo que, foi observado em células tumorais menor expressão de NTPDases, o que ocasiona em um acúmulo de ATP, que é apontado como a causa da morte das células não tumorais que circundam o tumor, permitindo, assim, o aumento da invasividade e proliferação das células tumorais (MORRONE, 2005).

Os nossos resultados em consonância com a literatura sugerem que ocorre algum mecanismo de regulação, pois existe diferença entre o perfil de expressão da enzima e a concentração de RNAm transcrito. A hipótese é de que ocorre algum mecanismo de regulação gênica podendo ser mediada por miRNAs nos tumores menos agressivos, o que reduz a expressão da NTPDase1.

Já os níveis relativos de RNAm da ecto-5'-nucleotidase foram maiores na linhagem MCF-10 (não tumoral), em seguida na linhagem MDA-MB231 (fenótipo triplo negativo, tumor mais agressivo) e por último na MCF-7 (fenótipo luminal, tumor menos agressivo). Houve diferença significativa entre as amostras das linhagens MCF-10 e MCF-7 ($p < 0,05$), e entre as amostras das linhagens MCF-7 e MDA-MB231 ($p < 0.001$) (Figura 2).

Figura 2 Gráfico representando os níveis relativos de RNAm da ecto-5'-nucleotidase em três linhagens de mama (MCF-10, MCF-7 e MDA-MB231): (***: $p < 0.001$; *: $p < 0.05$).



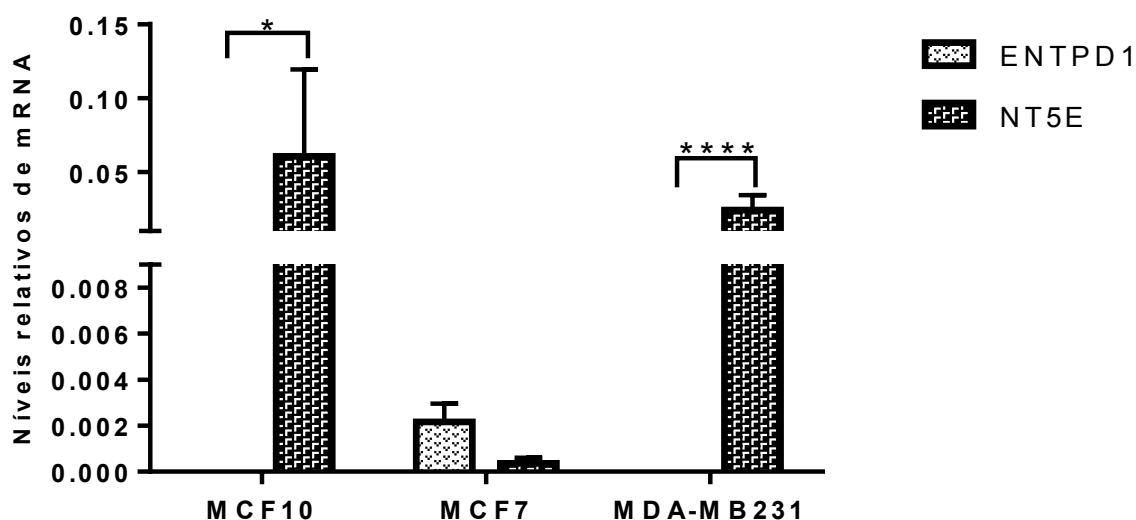
Fonte: Autoria própria

Tem-se conhecimento de que a expressão da enzima ecto-5'-nucleotidase é maior em células tumorais e que essa enzima desempenha um papel direto na progressão tumoral, regulando a vascularização tumoral (KOSZALKA et al, 2016). Também é frequentemente associada com um mau prognóstico, um risco aumentado de metástase e resistência à quimioterapia (ALLARD; TURCOTTE; STAGG, 2014) e se sabe que essa enzima promove o crescimento e a metástase do CM (YANG, X. et al., 2017). O fato de sua alta expressão estar associada à um mau prognóstico também foi observado em nosso trabalho, visto que, a linhagem celular MDA-MB231 possui maior nível de RNAm quando comparado com a linhagem celular MCF-7.

Resultados mostram que sua expressão está relacionada, também, à resistência a drogas múltiplas, e sua inibição ou a diminuição de sua expressão é capaz de inverter esse fenótipo de resistência a quimioterápicos e reduzir até 60% da viabilidade celular dos tumores quando é administrado o fármaco vincristina (QUEZADA et al., 2013). Isso sugere que possa ocorrer algum mecanismo de regulação pós-transcricional em células não tumorais. A hipótese levantada é a de que os miRNAs podem estar atuando nessa regulação.

Quando comparados os níveis de ambas as ectonucleotidases estudadas por linhagem celular observou-se que na linhagem MCF-10 possui maior concentração de RNAm da ecto-5'-nucleotidase ($p < 0,05$), na linhagem MCF-7 possui maior concentração RNAm da NTPDase1 (diferença não significativa) e linhagem MDA-MB231 possui maior concentração RNAm da ecto-5'-nucleotidase ($p < 0,0001$) (Figura 3).

Figura 3 Gráfico representando os níveis relativos de RNAm da ecto-5'-nucleotidase e da NTPDase1 por linhagem celular de mama (MCF-10, MCF-7 e MDA-MB231): (****: $p < 0,0001$; *: $p < 0,05$).



Fonte: Autoria própria

Nossos resultados corroboram com os resultados obtidos por Zhang et al. (2015), pois na linhagem MDA-MB231 houve-se maior expressão de RNAm da ecto-5'-nucleotidase quando comparado com a expressão de RNAm da NTPDase 1 e isso é associado à uma mau prognóstico, visto que, essa linhagem apresenta um fenótipo mais agressivo; já na linhagem MCF-7 houve maior expressão de RNAm da NTPDase 1 quando comparada com a expressão de RNAm da ecto-5'-nucleotidase.

Outros trabalhos apontam que as enzimas NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase são moduladores-chave da composição bioquímica do microambiente-tumoral e podem estar associadas à um mau prognóstico, visto que a inibição dessas ectonucleotidases resulta na melhora da imunidade antitumoral e melhora nas taxas de sobrevida dos pacientes (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

A elevada expressão de ambas as enzimas, tanto a nível de transcrito quanto de proteínas, foi observado em amostras de tumores adenocarcinomas endometrioides de tipo I e nos adenocarcinomas serosos de tipo II, e os resultados coincidiram com o maior grau de malignidade do tumor. Sendo que em adenocarcinomas serosos de tipo II houve uma maior expressão de NTPDase1 (ALIAGAS et al, 2014). Resultados semelhantes foram observados em tecidos de câncer ovariano (MONTALBÁN DEL BARRIO et al., 2016) e na linhagem de CM MDA-MB231 (LEDDEROSE et al, 2016).

A superexpressão da ecto-5'-nucleotidase e da NTPDase1 estão relacionadas com um mau prognóstico, pois essas enzimas possuem a capacidade de produzir Ado e, essa por sua

vez, promove uma imunossupressão (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017), isso também foi observado no nosso trabalho a nível de RNAm. E apesar de se ter alguns trabalhos que apontam a Ado como capaz de gerar efeito antitumoral, pela ativação dos receptores do tipo A₁, essa molécula é predominantemente associada à um efeito pró-tumorigênico, o que corrobora com nossos resultados (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

O efeito pró-tumorigênico da Ado e imunossupressor é bastante discutido, e ainda, não é completamente compreendido. Sabe-se que a proliferação de células T CD4⁺ é significativamente suprimida pela Ado extracelular durante a resposta imune contra o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) (SCHULER et al, 2016). Montalbán Del Barrio et al. (2016) também observaram que a Ado liberada inibe os linfócitos citotóxicos (T CD8⁺) em câncer de ovário. E em linhagens MDA-MB231 observou-se múltiplas bordas principais com alta expressão de receptores de Ado do tipo A₃, os quais, quando ativados, possibilitam a migração celular com frequentes mudanças direcionais. Além disso, já se sabe que o ambiente de hipóxia estimula a expressão dessas enzimas, aumentando assim a produção de Ado e induzindo à proliferação e seleção de células tumorais mais resistentes (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

Porém, essa alta expressão e atividade enzimática da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase não foi observada em melanoma cutâneo. Nesse tipo de câncer, a atividade enzimática dessas ectonucleotidases se apresentou significativamente diminuída em relação ao grupo controle, observando-se também um maior acúmulo de ATP/ADP em relação à Ado. Como nesse tipo de câncer tem aumento da atividade plaquetária e o ATP/ADP possuem atividade pró-agregante, o acúmulo dessas moléculas condizem com o esperado para esse tumor (SILVA et al, 2015).

4.2 Análises de expressão gênica *in silico*

As ferramentas utilizadas permitiram a obtenção de informações sobre as duas enzimas alvo do nosso estudo, NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase. A ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase1) é descrita como uma proteína de membrana plasmática que hidrolisa ATP e ADP extracelulares em AMP, sendo que hidrolisa igualmente bem ambos os substratos. Na ferramenta, essa enzima é descrita como atuante no sistema nervoso, hidrolisando ATP e outros nucleotídeos para regular a neurotransmissão purinérgica e também pode ser implicada na prevenção da agregação plaquetária hidrolisando o ADP, um potente ativador de plaquetário. A reação catalisada por essa enzima é a representada abaixo. Seus

Já a ecto-5'-nucleotidase é descrita como a enzima responsável pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares monofosfatados em nucleosídeos permeáveis à membrana, tendo como cofator principal o zinco (Zn^{2+}) (BAO et al., 2016; CAPPELLARI et al., 2012a). Assim, essa enzima possui a função de hidrolisar AMP, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e Nicotinamida nucleotídeo adenililtransferase (NMN-nucleosídeo) por meio da reação química representada abaixo:

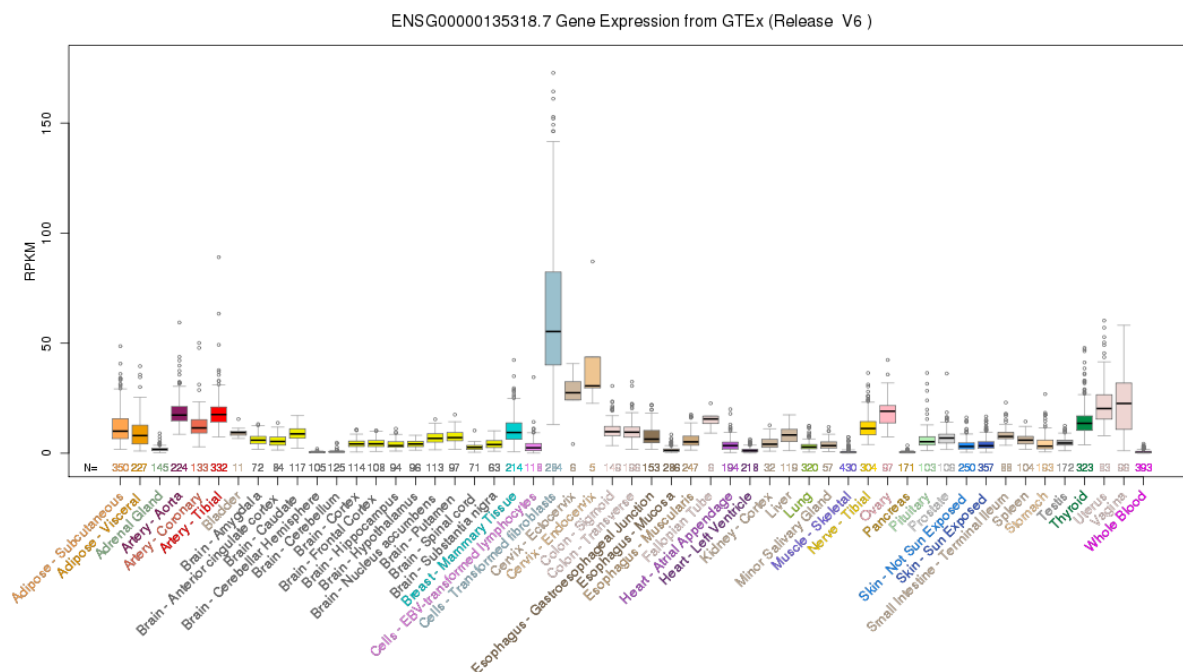


As mutações no gene dessa enzima são apontadas como causa de calcificação das articulações e das artérias (CALJA), descrita como a condição caracterizada pela calcificação das artérias das extremidades inferiores e das articulações da cápsula do pé e da mão no início da fase adulta (por volta dos 20 anos de idade). Além da calcificação de articulações e artérias, alterações na expressão e na estrutura da ecto-5'-nucleotidase podem resultar na tuberculose intestinal. Duas variantes de transcrição que codificam diferentes isoformas foram encontradas para este gene (BAO et al., 2016; CAPPELLARI et al., 2012a).

A ferramenta *Genome Browser* também disponibiliza um gráfico que representa dados da ferramenta GTEx de expressão do RNAm desse gene validados em 53 tecidos e em amostras de 570 doadores (Figura 5). A expressão mediana mais alta foi de 55,31 RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) em células de fibroblastos transformados e a expressão média total foi de 457,71 RPKM. Resultados para outros tecidos podem ser observados na figura 5.

O que se observa é que em tecidos diferentes existe uma variação na expressão dessa enzima e até mesmo em amostras de um mesmo órgão, mas em partes diferentes, a expressão é desigual, como no caso do cérebro. No tecido de mama, a expressão deste RNA é de 9.4 RPKM (aproximadamente seis vezes menor do que a expressão mediana mais alta e 3 vezes maior do que o valor encontrado para a NTPDase1 no mesmo tecido evidenciando, portanto, que, no que se refere ao tecido mamário, a expressão de RNAm de ecto-5'-nucleotidase é maior do que de NTPDase1). Não se tem informações sobre CM, apenas sobre o tecido normal.

Figura 5 Dados da ferramenta GTEx de expressão do RNAm da ecto-5'-nucleotidase.



Fonte: Ferramenta GTEx.

O fato de que essas enzimas são mais expressas em células transformadas, como observado na ferramenta GTE_x, é comprovado por outros estudos, visto que, nesses tecidos tem-se a necessidade de maior concentração de Ado extracelular (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

Tendo em vista, o papel das ectonucleotidasas na progressão e metástase do CM, como observado nos nossos resultados, tem-se notado a necessidade de encontrar moléculas ou métodos que atuem regulando essas enzimas para o tratamento ou diagnóstico do CM. TERP et al (2013) produziram anticorpos monoclonais capazes de causar o agrupamento da ecto-5'-nucleotidase na superfície celular, seguido por internalização da mesma, o que causa a inibição da capacidade das células tumorais circulantes extravasarem e colonizarem e causarem metástase. Pesquisas apontam que o fumarato de hidrogênio de tiamulina também possuem capacidade de inibir a ecto-5'-nucleotidase e inibir seus efeitos em CM, aumentando as taxas de sobrevida (YANG, X. et al., 2017). Além disso, se sabe que a administração de um inibidor dessa ectonucleotidase, juntamente com um inibidor de receptores de Ado do tipo A₃ favorece o tratamento de câncer com células dendríticas (ARAB et al, 2017). Dessa forma, a identificação de miRNAs que regulam a expressão dessas enzimas é de grande importância científica e médica.

4.3 Busca in silico de miRNAs

4.3.1 Ferramentas do software *miRTarBase*

No software *miRTarBase*, foi, inicialmente, realizada uma busca dos miRNAs relacionados com o CM, para, então, serem comparados com os dados referentes aos miRNAs identificados nos diferentes softwares e que tem como alvo os RNAm da NTPDase1 e ecto-5'-nucleotidase. Dessa forma foram identificados 69 miRNAs diferentes que estão envolvidos com o desenvolvimento de CM (Tabela 2).

Tabela 2 miRNAs identificados pelo software *miRTarBase* que possuem relação como o desenvolvimento do CM.

miRNAs		
hsa-let-7a-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-let-7g-5p
hsa-miR-100-5p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-103a-3p
hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-107	hsa-miR-1226-3p
hsa-miR-124-3p	hsa-miR-125a -5p	hsa-miR-125b-5p
hsa-miR-127-3p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-133a-3p
hsa-miR-134-5p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-143-3p
hsa-miR-145-5p	hsa-miR-149-5p	hsa-miR-155-5p
hsa-miR-17-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-185-5p
hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-190a-5p	hsa -miR- 193a-3p
hsa-miR-195-5p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-200a-3p
hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-214-3p
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-217	hsa-miR-223-3p
hsa-miR-24-3p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-26b-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-29a-3p
hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30c-5p
hsa-miR-31-5p	hsa-miR-323b-5p	hsa-miR-331-3p
hsa-miR-339-5p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-34a-5p
hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-375	hsa-miR-376b-3p
hsa-miR-424-5p	hsa-miR-448	hsa-miR-487a-3p
hsa-miR-498	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-541-3p
hsa-miR-552-3p	hsa-miR-630	hsa-miR-708-5p
mmu-miR-10b-5p	mmu-miR-29a-3p	mmu-miR-98-5p

Fonte: Autoria própria.

Em seguida foi feita a busca de miRNAs que tenham como alvo os RNAm das enzimas de interesse. Tendo como alvo a NTPDase1, foram identificados 48 miRNAs diferentes (Tabela 3), pertencentes à 41 famílias de miRNAs. Ainda, foram identificados 11 miRNAs que estão relacionados com CM, de acordo com outra ferramenta do software, são eles: hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-107, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-331-3p e hsa-miR-424-5p.

Tabela 3 miRNAs identificados pelo software miRTarBase que possuem como alvo a NTPDase1.

miRNAs		
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-107	hsa-miR-122-5p
hsa-miR-1273g-3p	hsa-miR-1285-3p	hsa-miR-142-3p
hsa-miR-155-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-15b-5p
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-214-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-29c-3p
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-30c-5p
hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-3187-5p
hsa-miR-3190-3p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-346
hsa-miR-361-5p	hsa-miR-3617-3p	hsa-miR-3619-5p
hsa-miR-374a-3p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-4291
hsa-miR-4491	hsa-miR-4657	hsa-miR-4694-3p
hsa-miR-4793-3p	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-504-3p
hsa-miR-508-5p	hsa-miR-511-5p	hsa-miR-5189-5p
hsa-miR-5682	hsa-miR-6079	hsa-miR-612
hsa-miR-624-5p	hsa-miR-633	hsa-miR-6503-3p
hsa-miR-6512-3p	hsa-miR-6514-5p	hsa-miR-654-3p

Fonte: Autoria própria.

Já para o alvo ecto-5'-nucleotidase foram identificados cinco miRNAs, pertencentes à cinco famílias de miRNAs diferentes (Tabela 4), estando quatro deles relacionados com o CM: hsa-miR-124-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-miR-34a-5p.

Tabela 4 miRNAs identificados pelo software miRTarBase que possuem como alvo a ecto-5'-nucleotidase.

miRNAs		
hsa-miR-124-3p	hsa-miR-1-3p	hsa-miR-155-5p
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-34a-5p	

Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Software *TargetScanHuman* 7.1

Por meio do software TargetScanHuman 7.1 foi possível a identificação de 11 miRNAs diferentes que tem como alvo a NTPDase1 (Tabela 5), pertencendo a oito famílias diferentes de miRNAs. Três dos miRNAs encontrados já haviam sido relacionados com o CM no software *miRTarBase*, são eles: hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p e hsa-miR-193a-3p.

Tabela 5 miRNAs identificados pelo software TargetScanHuman 7.1 que possuem como alvo a NTPDase1.

miRNAs		
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-135a-5p

hsa-miR-135b-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-150-5p
hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-4319
hsa-miR-5590-3p	hsa-miR-9-5p	

Fonte: Autoria própria.

Para o alvo ecto-5'-nucleotidase, foram identificados 34 miRNAs diferentes (Tabela 6), sendo 29 famílias diferentes de miRNAs. Entre estes, três miRNAs já haviam sido relacionados com o CM no software *miRTarBase*, são eles: hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30c-5p e hsa-miR-374a-5p.

Tabela 6 miRNAs identificados pelo software TargetScanHuman 7.1 que possuem como alvo a ecto-5'-nucleotidase.

miRNAs		
hsa-miR-1277-5p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-190a-3p
hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-212-3p	hsa-miR-30a-5p
hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-30d-5p
hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-3121-3p	hsa-miR-323a-3p
hsa-miR-369-3p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-374b-5p
hsa-miR-383-5p.2	hsa-miR-4274	hsa-miR-4519
hsa-miR-5011-5p	hsa-miR-507	hsa-miR-520d-5p
hsa-miR-524-5p	hsa-miR-545-5p	hsa-miR-548an
hsa-miR-557	hsa-miR-5580-3p	hsa-miR-5589-3p
hsa-miR-5692b	hsa-miR-5692c	hsa-miR-5694
hsa-miR-642b-5p	hsa-miR-6504-3p	hsa-miR-656-3p
hsa-miR-935		

Fonte: Autoria própria.

4.3.3 Ferramentas do software *DIANA TOOLS*

Por meio do software *DIANA TOOLS* foram identificados, ao todo, 46 miRNAs que têm como alvo o RNAm da NTPDase1, pertencentes à 45 famílias diferentes. De acordo com o software *miRTarBase*, nenhum dos miRNAs identificados por esse software tem relação com o CM. Como foram usadas as duas ferramentas, foram identificados 30 miRNAs na ferramenta microT-CDS (Tabela 7) e 16 na TarBase v7.0 (Tabela 8).

Tabela 7 miRNAs identificados pela ferramenta microT-CDS do software DIANA TOOLS que possuem como alvo a NTPDase1.

miRNAs		
hsa-miR-1304-5p	hsa-miR-153-5p	hsa-miR-205-3p
hsa-miR-2467-5p	hsa-miR-3119	hsa-miR-3148
hsa-miR-3163	hsa-miR-340-5p	hsa-miR-4282
hsa-miR-4470	hsa-miR-4659b-5p	hsa-miR-4677-5p

hsa-miR-4742-3p	hsa-miR-4778-3p	hsa-miR-5001-3p
hsa-miR-519d-5p	hsa-miR-539-5p	hsa-miR-548e-5p
hsa-miR-548l	hsa-miR-5681a	hsa-miR-5692a
hsa-miR-583	hsa-miR-6730-5p	hsa-miR-6825-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-758-3p	hsa-miR-7856-5p
hsa-miR-8054	hsa-miR-8070	hsa-miR-9-5p

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 miRNAs identificados pela ferramenta TarBase v7.0 do software DIANA TOOLS que possuem como alvo a NTPDase1.

miRNAs		
hsa-miR-142-3p	hsa-miR-29b-2-5p	hsa-miR-4518
hsa-miR-140-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-5010-3p
hsa-miR-2110	hsa-miR-346	hsa-miR-590-3p
hsa-miR-221-3p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-641
hsa-miR-222-3p	hsa-miR-3928	hsa-miR-93-3p
hsa-miR-223-3p		

Fonte: Autoria própria.

Para o alvo ecto-5'-nucleotidase, foram identificados 54 miRNAs, sendo pertencentes à 46 famílias. Entre os miRNAs identificados, seis são relacionados com o CM pelo software *miRTarBase*, são eles: hsa-miR-124-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p e hsa-miR-30c-5p. Dos 54 miRNAs identificados, 30 foram identificados pela ferramenta microT-CDS (Tabela 9) e 24 foram identificados pela ferramenta TarBase v7.0 (Tabela 10).

Tabela 9 miRNAs identificados pela ferramenta microT-CDS do software DIANA TOOLS que possuem como alvo a ecto-5'-nucleotidase.

miRNAs		
hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-203a-5p
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-30c-5p
hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-3163	hsa-miR-3164
hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-3606-3p	hsa-miR-378a-3p
hsa-miR-378c	hsa-miR-378g	hsa-miR-422a
hsa-miR-4282	hsa-miR-4425	hsa-miR-4495
hsa-miR-4496	hsa-miR-4647	hsa-miR-4677-5p
hsa-miR-4752	hsa-miR-4753-3p	hsa-miR-4791
hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-590-3p	hsa-miR-6515-3p
hsa-miR-6820-3p	hsa-miR-7160-3p	hsa-miR-7850-5p

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 miRNAs identificados pela ferramenta TarBase v7.0 do software DIANA TOOLS que possuem como alvo a ecto-5'-nucleotidase.

miRNAs		
hsa-miR-1	hsa-miR-124-3p	hsa-miR-129-5p

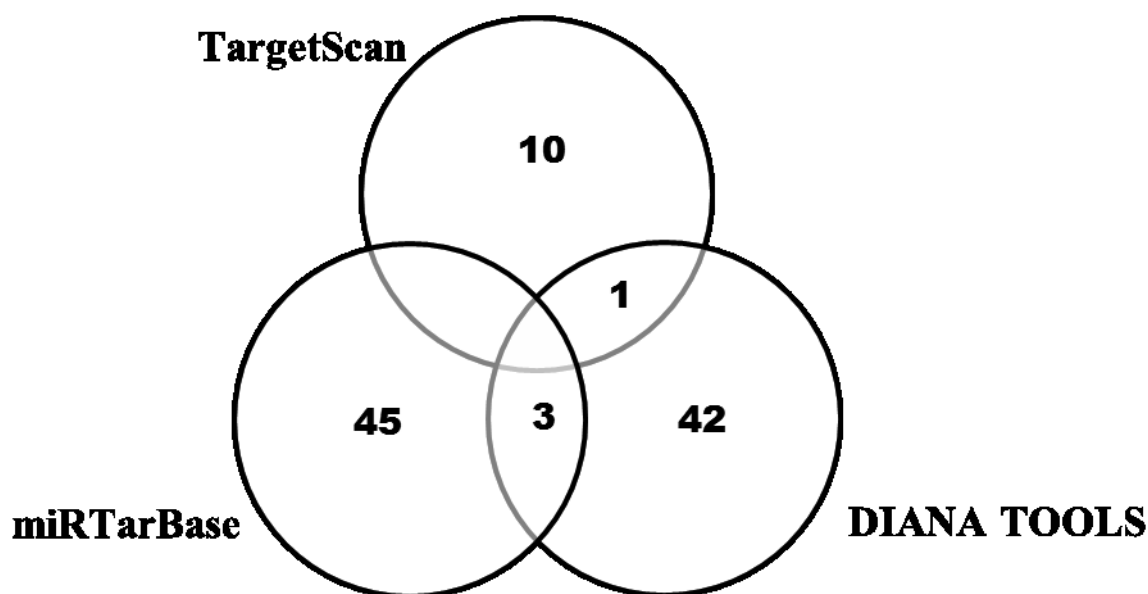
hsa-miR-138-1-3p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-17-3p
hsa-miR-202-5p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-21-5p
hsa-miR-22-3p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-23b-3p
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-345-5p	hsa-miR-34a-5p
hsa-miR-378g	hsa-miR-421	hsa-miR-424-3p
hsa-miR-449a	hsa-miR-4511	hsa-miR-506-3p
hsa-miR-573	hsa-miR-616-3p	hsa-miR-876-3p

Fonte: Autoria própria.

4.3.4 Análise dos resultados de todos os softwares

Analisando as informações obtidas nos três softwares de Bioinformática, foi possível determinar quais miRNAs seriam mais explorados por esse trabalho. De forma geral, combinando-se os dados dos softwares, foram identificados 101 miRNAs que têm como alvo a NTPDase 1. Além disso, foi observado se havia miRNAs identificados por mais de um software (Figura 6, Tabela 11). Dessa forma, três dos miRNAs foram identificados tanto no *miRTarBase* quanto no *DIANA TOOLS*, e um dos miRNAs foi identificado tanto no *TargetScanHuman 7.1* quanto no *DIANA TOOLS*.

Figura 6 Diagrama de Venn demonstrando os resultados obtidos para a identificação dos miRNAs e mostrando a quantidade de miRNAs identificados em mais de um software que tem como alvo a NTPDase1.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 Resultados dos três softwares para o alvo NTPDase1.

	TargetScan	miRTarBase	DIANA tarBase	DIANA microT
miRNAs	11	48	16	30

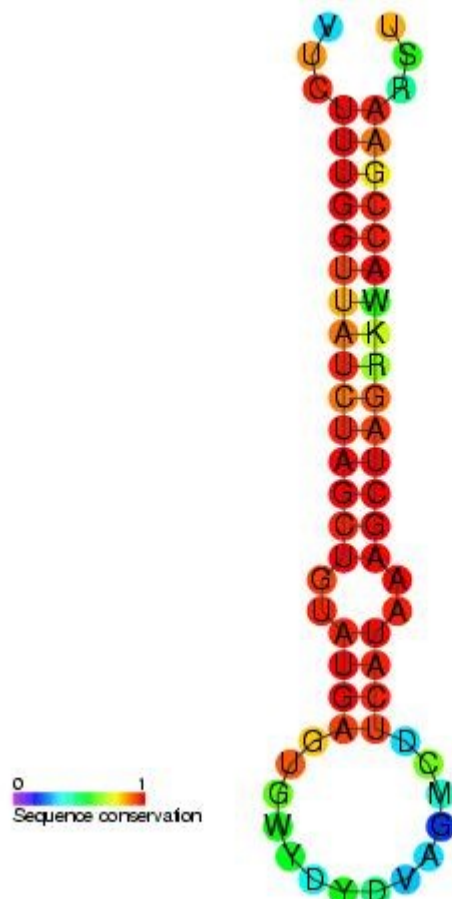
famílias de miRNAs	8	41	16	29
miRNAs relacionados com o câncer de mama	3	11	1	0

Fonte: Autoria própria.

Para a seleção dos miRNAs, foram observados os miRNAs identificados em mais de um software e que tinham sido relacionados com o CM. Porém, como a NTPDase1 possui diversas variantes foram identificados muitos e diferentes miRNAs, o que ocasionou em poucos miRNAs semelhantes em diferentes softwares e que ainda tivessem relação com o CM. Dessa forma, selecionou-se os miRNAs: hsa-miR-9-5p, hsa-miR-331-3p e hsa-miR-346.

O hsa-miR-9-5p (Figura 7) foi identificado como tendo por alvo a NTPDase1 tanto no *TargetScanHuman* quanto no *DIANA TOOLS*, ferramenta MicroT-CDS. Esse miRNA possui alguns sítios de ligação no alvo, porém o mais conservado é o do tipo 7mer-A1. De acordo com o software *TargetScanHuman*, o miR-9 nos vertebrados, é altamente expresso no cérebro e é sugerido para regular a diferenciação neuronal. Esse miRNA, entretanto, não foi identificado como relacionado com o CM pelo software *miRTarBase*.

Figura 7 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-9-5p.



Fonte: <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/33/RF00237.jpg>>.

Não se tem informações na literatura sobre a atuação do miR-9 na regulação da expressão da NTPDase1 ou de genes envolvido na via de sinalização da mesma, o que se tem são informações de outros RNAs alvos: E-caderina (WANG, J. et al., 2013), Notch homólogo 1 (NOTCH1) (MOHAMMADI-YEGANEH; MANSOURI; PARYAN, 2015), Integrina 1 (ZAWISTOWSKI et al., 2013), Complexo de proteína AP3 com subunidade β 1 (AP3B1), Ciclina G1 (CCNG1), Membro da família do domínio da ribonucleoproteína 1 (LARP1), Metilenotetrahidrofolato desidrogenase (NADP + dependente) semelhante à 1 (MTHFD1L), Metilenotetrahidrofolato desidrogenase (NADP + dependente) 2 (MTHFD2) e o gene da proteína quinase 1 de domínio rico em serina e arginina (SRPK1) (SELCUKLU et al., 2012). Porém, isso não sugere que esse miRNA não regule a expressão dessa enzima.

Os miRNAs da família hsa-miR-9 são apontados por Lu et al (2016) como miRNAs oncogênicos (oncomiRNA), sendo que seus estudos apontam que a expressão desse miRNA foi maior em tecidos de laringo-carcinoma em comparação com seus controles não tumorais, e a expressão dele pode promover a proliferação celular e a metástase. Nesse caso, o alvo é o homólogo de fosfatase e tensina (PTEN). No caso do CM, achados apontam que as expressões mais elevadas de miR-9, juntamente com o miR-200c, estão associadas a um fenótipo mais invasivo (WANG, J. et al., 2013) e está associada a um mau prognóstico no CM (GWAK et al., 2014).

Esses resultados corroboram com a hipótese de que a enzima NTPDase1 é regulada por ação desse miRNA na linhagem MCF-7. Porém, aparentemente, esse miRNA não atua regulando a expressão dessa enzima na linhagem MDA-MB231, pois nessa linhagem tem-se pouco RNA transcrito e alta expressão de proteínas, isso sugere a não atuação desse miRNA e sugere também que talvez nessa linhagem, a região do RNA que se liga ao miRNA esteja mutada, portanto não ocorre ligação e regulação.

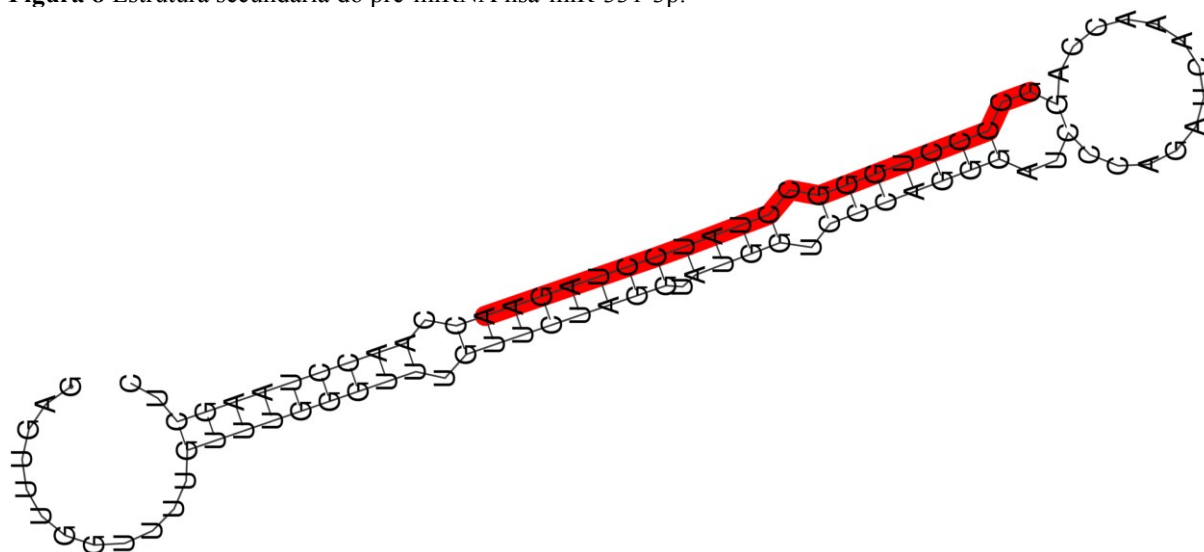
Outros autores apresentam resultados que divergem desses, sendo que apontam o miR-9 na verdade possui atividades antiproliferativas, anti-invasivas e pró-apoptóticas (MOHAMMADI-YEGANEH; MANSOURI; PARYAN, 2015), sendo que sua expressão é menor em células de CM MDA-MB-231 em comparação com a linhagem celular não tumoral de mama MCF-10A, como mostrado por Zawistowski et al. (2013) e também é menos expresso em MCF-7 em comparação com a linhagem celular não tumoral de mama MCF-10-2A (SELCUKLU et al., 2012). Porém, ainda tendo por base esses resultados, não é possível afirmar que a NTPDase1 sofra regulação por esse miRNA, pois ele é menos expresso na linhagem

MCF-7 em comparação com a MCF-10-2A, e o que se esperaria em face dos resultados obtidos nos ensaios de qPCR era justamente o inverso.

Além disso, apesar de não se ter conhecimento da relação desse miRNA com a resistência a quimioterápicos em pacientes com CM, tem-se conhecimento que a superexpressão do miR-9 foi capaz de reverter a resistência das células tumorais aos quimioterapêuticos em pacientes com leucemia mielóide crônica (LI et al., 2017). Já esse trabalho contribui para afirmação de que a presença desse miRNA em tumores menos agressivos, regula a expressão da NTPDase1, controlando os níveis de Ado extracelular e diminuindo a resistência a quimioterápicos.

Já o hsa-miR-331-3p (Figura 8) foi identificado no software *miRTarBase* e no *DIANA TOOLS*, ferramenta TarBase. De acordo com o software, o método de validação usado para esse miRNA foi o sequenciamento de Nova Geração e ele está relacionado com doenças prostáticas e leucemia, além do CM.

Figura 8 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-331-3p.



Fonte: <<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/data/miRBase/hsa-miR-331-3p.png>>.

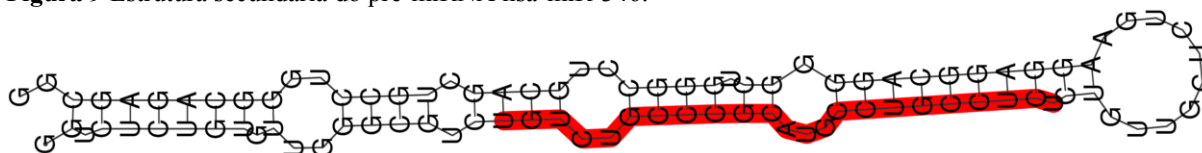
Sobre o hsa-miR-331-3p, existem poucos estudos relacionando-o com o CM. Um dos estudos aponta que esse miRNA atua como inibidor da sinalização HER2 e do crescimento celular, sendo que, em CM do tipo HER2-positivo, esse miRNA é menos expresso quando comparado com células de controle HER2-negativas. Dessa forma, tem-se a sugestão de utilização do miR-331-3p para prevenção e inibição terapêutica desse tipo de câncer (LEIVONEN et al., 2013). Zhao, Sui e Zheng (2016) encontraram resultados parecidos em

câncer colorretal, sendo que esse miRNA é menos expresso em células tumorais e está associado a regulação do crescimento celular, promovendo a apoptose e inibindo a proliferação.

Para se afirmar que o hsa-miR-331-3p está regulando a expressão de NTPDase1 em CM são necessários outros estudos, pois não é possível inferir com certeza sobre seu efeito com base apenas em resultados de um tipo específico de CM e com um único alvo descrito. O que mais se tem informações é sobre a relação desse miRNA com o carcinoma hepatocelular, já sendo descrito como alvos o gene do inibidor do crescimento membro da família 5 (ING5) (CAO et al., 2015) e da proteína fosfatase rica em repetições leucina e domínios PH (PHLPP) (CHANG et al., 2014), estando associado em ambos os trabalhos com a proliferação e a metástase, além disso é apontado como um biomarcador para o prognóstico desse câncer (CHEN et al., 2015).

O hsa-miR-346 (Figura 9) também foi identificado no software *miRTarBase* e no *DIANA TOOLS*, ferramenta TarBase. De acordo com o software, o método de validação usado para esse miRNA foi o Microarray e ele é apontado como relacionado com diversas doenças como lúpus, artrite, carcinoma e reumatismo, além do CM.

Figura 9 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-346.



Fonte: <<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/data/miRBase/hsa-miR-346.png>>.

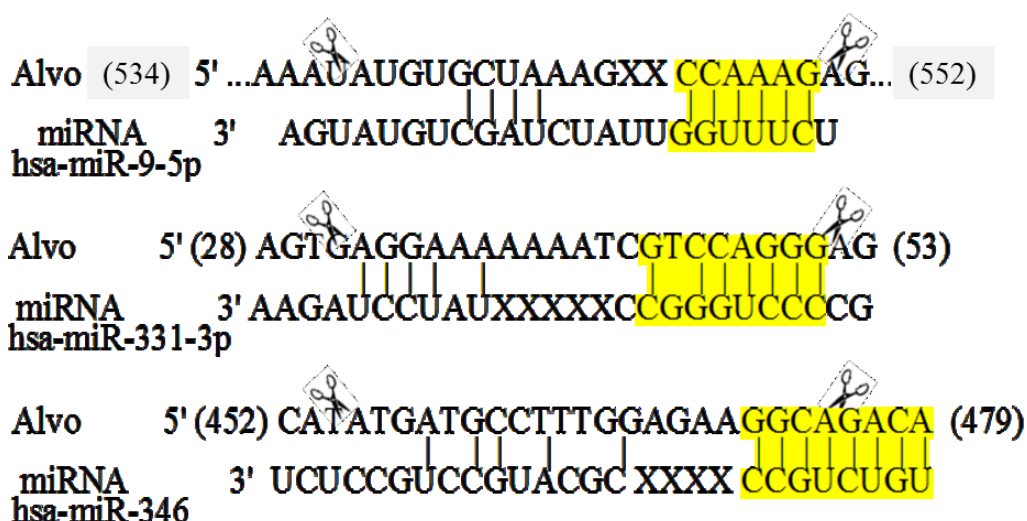
Estudos afirmam que esse miRNA em diferentes tipos de câncer apresentou a capacidade de promover o aumento da malignidade, invasividade de células (GUO et al., 2015; YAN et al., 2016), proliferação celular, formação de colônias, redução da apoptose e sensibilidade ao Docetaxel (Doc) (YANG, F. et al., 2017). Esses dados foram encontrados para câncer de colo de útero, sendo que o alvo apontado desse miRNA foi a Argonauta 2 (AGO2) (GUO et al., 2015); CM, sendo o alvo o gene inibidor de sinalização de quinase SRC 1 (SRCIN1) (YANG, F. et al., 2017); células cancerosas nasofaríngeas, tendo como alvo o gene supressor de metástase de câncer de mama 1 (BRMS1) (YAN et al., 2016); e carcinoma, tendo como alvo o gene SRCIN1 (CHEN et al., 2015).

Isso indica que em células tumorais mais agressivas esse miRNA é mais expresso, o que leva à regulação da expressão de NTPDase1, mostrando que a baixa expressão dessa enzima está associada a um mau prognóstico como descrito por Zhang et al. (2015). Em

contrapartida, Chen et al (2014) demonstraram que o miR-346 inibe o VDR, isso ocasiona o aumento da infiltração de células imunes, ou seja, está relacionado com a ativação da resposta imune tumoral, sendo mais expressos em tumores menos agressivos, como na linhagem MCF-7, corroborando com a hipótese de que nessas linhagens tem-se a regulação da expressão gênica mediada por miRNAs.

Na Figura 10, está representada a atuação dos miRNAs selecionados sobre o alvo (RNAm da NTPDase1).

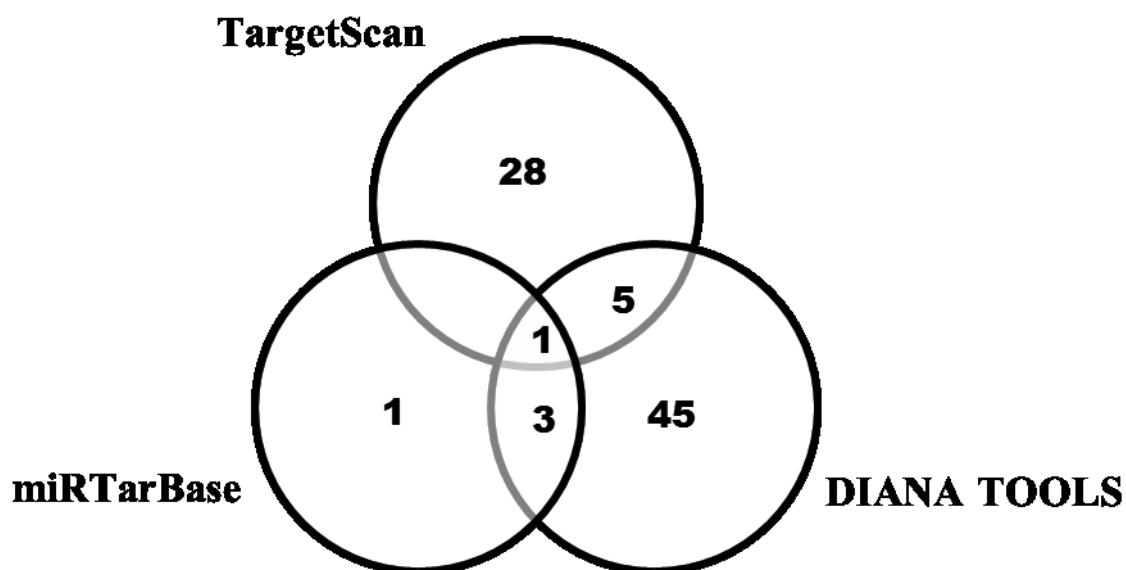
Figura 10 miRNAs selecionados que possuem como alvo o RNAm da NTPDase1 e o local onde se ligam ao alvo promovendo a degradação ou não tradução do gene.



Fonte: Autoria própria.

Para o alvo ecto-5'-nucleotidase foram identificados, combinando-se os dados dos três softwares, 83 miRNAs, sendo que três deles foram identificados tanto no *miRTarBase* quanto no *DIANA TOOLS*; cinco foram identificados tanto no *TargetScanHuman* quanto no *DIANA TOOLS*; e um deles foi identificado em todos os softwares (Figura 11 e Tabela 12).

Figura 11 Diagrama de Venn demonstrando os resultados obtidos para a identificação dos miRNAs e mostrando a quantidade de miRNAs identificados em mais de um software que tem como alvo o mRNA da ecto-5'-nucleotidase.



Fonte: Autoria própria.

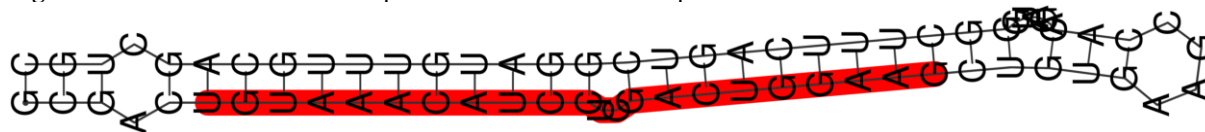
Tabela 12 Resultados dos três softwares para o alvo ecto-5'-nucleotidase.

	TargetScan	miRTarBase	DIANA tarBase	DIANA microT
miRNAs	34	5	24	30
famílias de miRNAs	29	5	23	23
miRNAs relacionados com o câncer de mama	3	4	5	2

Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, foram analisados os miRNAs: hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-155-5p e hsa-miR-34a-5p. O miRNA hsa-miR-30a-5p (Figura 12) foi identificado como tendo por alvo a ecto-5'-nucleotidase pelos três softwares. Dentre os sítios de ligação do miRNA, o mais conservado é do tipo 9mer. De acordo com os softwares *miRTarBase* e *DIANA TOOLS*, os métodos de validação desse miRNA foram proteômicos e etiquetagem por aminoácidos isotópicos em cultura de células. Esse miRNA é muito expresso no rim e pode estar envolvido em diversas doenças, sendo as que possuem mais informações são as neoplasias, carcinomas, infecções, lúpus, patologias associadas aos ovários, pulmões e também é relacionado com o CM.

Figura 12 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-30a-5p.



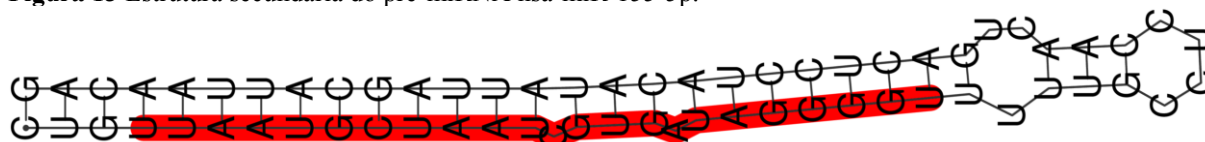
Fonte: <<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/data/miRBase/hsa-miR-30a-5p.png>>.

Estudos são contraditórios quanto às informações sobre miRNAs da família miR30 e sua relação com o CM. Chang et al (2016) apontam esse miRNA como um dos 12 miRNAs identificados que promoveu melhor sobrevivência ao CM. Porém, Dobson et al (2014) identificaram que o hsa-mir30c são mais expressos em células metastáticas de linhagens MDA-MB-231 e estão associados a uma fraca sobrevida das pacientes. Em outros tipos de câncer, miRNAs dessa família também foram associados à um mau prognóstico (LIU et al., 2016), promoção do crescimento celular e da capacidade de formação de colônias e aumento da migração celular e da invasão (WANG, K. et al., 2013); além de manutenção da auto-renovação e inibição da apoptose em células iniciadoras do tumor de mama (YU et al., 2010). Ainda, foram identificados como mais expressos em células com resistência à quimioterapia do câncer de ovário (LIU et al., 2016) e em células de gliomas (WANG, K. et al., 2013) em comparação com os respectivos controles.

Porém, outros estudos apontam essa família de miRNA como supressores de tumor, como mostrado pelos estudos de Li et al (2016), a superexpressão do miR-30a-5p suprimiu a proliferação, migração e invasão de células de CM. Além disso, miRNAs da família miR-30 foram associados à redução da progressão do tumor mamário (OUZOUNOVA et al., 2013) e apontados como um dos genes supressores de tumor no desenvolvimento de CM e metástase (ZHANG et al., 2014). Portanto, esses resultados corroboram com nossa hipótese.

Já o miRNA hsa-miR-155-5p (Figura 13) foi identificado no software *miRTarbase* e *DIANA TOOLS*. Dentre os sítios de ligação do miRNA, o mais conservado é do tipo 7mer. De acordo com os softwares, os métodos de validação desse miRNA também foram proteômicos e etiquetagem por aminoácidos isotópicos em cultura de células. O hsa-miR-155-5p está associado a diversos processos patológicos, sendo mais influente em neoplasia, carcinoma, CM, leucemia, inflamações e colite pancreática.

Figura 13 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-155-5p.



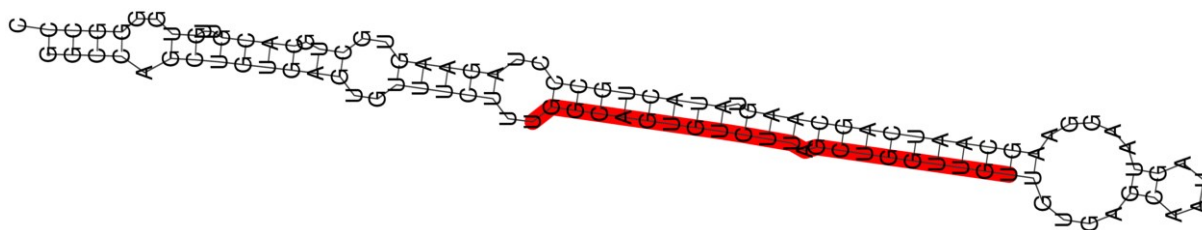
Fonte: <<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/data/miRBase/hsa-miR-155-5p.png>>.

Esse miRNA é mais apontado na literatura como um oncomiRNA (ROBERTSON et al., 2014), envolvido na ativação de linfócitos (YIN et al., 2008), sendo mais expresso em células tumorais do que em células não tumorais (QU et al., 2016), estando relacionado à um mau prognóstico (CHANG et al., 2014). Em melanomas, esse miRNA foi mais expresso do que nas células não tumorais, e ainda, esse miRNA foi identificado no ambiente extracelular (RNA exossomal) (LUNAVAT et al., 2015). Ainda, hsa-miR-155-5p também foi relacionado a respostas em estados de hipóxia, sendo que foi apontado como tendo por alvo o RNAm do gene Fator de transcrição ETS (ELK3), que apresenta relação com o aumento da sobrevivência e da angiogênese em tumores hipóxicos (ROBERTSON et al., 2014). Outro resultado interessante encontrado na literatura foi que a proteína 53 (p53) mutada induz a expressão desse miRNA, que por sua vez atua em diversos alvos, como o RNAm do gene da proteína de “dedo de zinco” 652 (ZNF652), que está correlacionado com o aumento da invasão local e aumento da metástase em tumores de mama primários (NEILSEN et al., 2013). Esses trabalhos demonstram resultados que impedem a afirmação de que esse miRNA atua regulando a ectonucleotidase estudada.

Poucos trabalhos apresentam o hsa-miR-155-5p como menos expresso em câncer do que em tecidos normais, Zhang et al. (2017) notou uma baixa expressão desse miRNA em câncer gástrico, porém como esse trabalho foi um dos únicos a apresentar esses resultados, os autores sugeriram que tumores diferentes possuíam diferentes perfis de expressão desse miRNA. Para saber se esse miRNA é mais ou menos expresso nas linhagens celulares de mama utilizadas nesse trabalho e se existe a regulação da ecto-5'-nucleotidase por esse miRNA são necessários a realização de experimentos comprobatórios

O miRNA hsa-miR-34a-5p (Figura 14) também foi identificado pelos softwares *miRTarbase* e *DIANA TOOLS*. O sítio de ligação desse miRNA de maior conservação é do tipo 8mer. De acordo com os softwares, os métodos de validação desse miRNA foram análises por microarrays juntamente com etiquetagem por aminoácidos isotópicos em cultura de células. Esse miRNA está relacionado com doenças como leucemia, carcinoma, CM e câncer pancreático.

Figura 14 Estrutura secundária do pre-miRNA hsa-miR-34a-5p



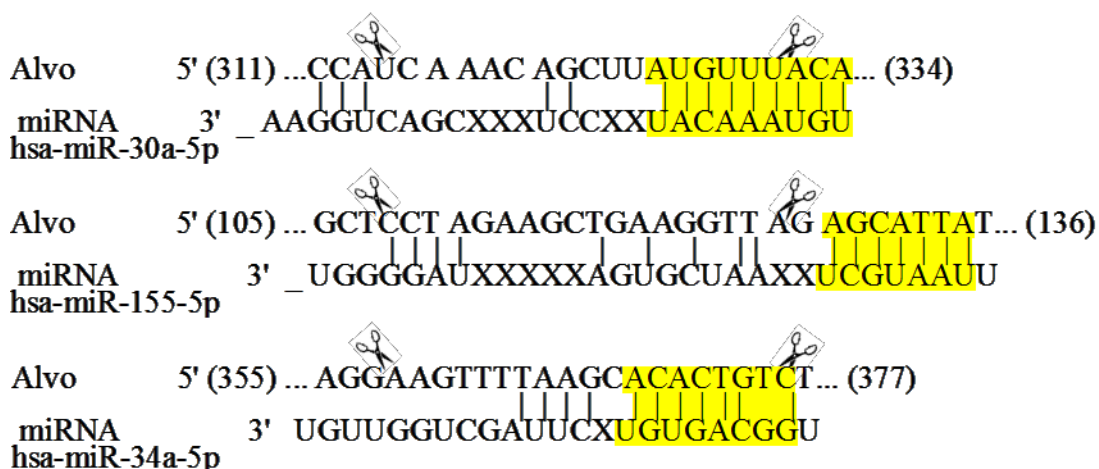
Fonte: <<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/data/miRBase/hsa-miR-34a-5p.png>>.

Esse miRNA ora é descrito como supressor de tumor, ora é descrito como oncomiRNA. Daugaard et al. (2017) em seus resultados não observaram diferença significativa entre a expressão desse miRNA em células de adenocarcinoma pulmonar quando comparado com o controle não tumoral. Porém, outros trabalhos associam miRNA da família miR-34 com um mau prognóstico, pois sua alta expressão causa uma baixa expressão de genes antioxidantes (GUO et al., 2017) e está relacionado à resistência adquirida ao docetaxel em linhagens de CM (MCF-7 e MDA-MB231) (KASTL; BROWN; SCHOFIELD, 2012). Esses resultados vão de encontro à nossa hipótese de regulação.

Outros autores, entretanto, obtiveram resultados que relacionam esse miRNA a um bom prognóstico e corroboram com nossa hipótese. Tem-se conhecimento de que, miR-34a/b/c possuem a capacidade de suprimir a formação do tumor e controlar a célula-tronco intestinal e a homeostase das células secretoras (JIANG; HERMEKING; 2017). Além disso, esse miRNA foi caracterizado como capaz restaurar a função de p53, em pacientes com p53 mutada, aumentando, assim, a apoptose e diminuindo a viabilidade, o índice de proliferação e a invasão celular (JAFARI; ABEDIANKENARI, 2017). Essa característica supressora de tumor, identificada nesses trabalhos, para o miR-34a já tem sido explorada para criação de terapia contra CM triplo negativo, sendo que Deng et al (2014) desenvolveram nanopartículas de ácido hialurônico-quitosano para co-entrega de miR-34a e doxorrubicina e obtiveram bons resultados no quesito supressão do tumor nas células mamárias em que administraram as nanopartículas.

Na Figura 15 está representada a atuação dos miRNAs selecionados sobre o alvo (RNAm da ecto-5'-nucleotidase).

Figura 15 miRNAs selecionados que possuem como alvo o RNAm da ecto-5'-nucleotidase, e o local onde se ligam ao alvo promovendo a degradação ou não tradução do gene.



Fonte: Autoria própria.

Tendo em vista os resultados apresentados no presente estudo sobre a regulação pós-transcricional dessas ectonucleotidases, permite afirmar, que possivelmente ocorre regulação mediada por miRNAs, porém não rejeita a hipótese que outros mecanismos de regulação gênica estejam ocorrendo. Sendo que, alguns resultados apontam que essas enzimas podem sofrer regulação pós-traducional, como mostrado por Lo Nigro et al (2012), que encontrou uma regulação por metilação da ecto-5'-nucleotidase, sendo que pacientes que possuem essa metilação eram menos propensos a desenvolver metástases e apresentaram melhor sobrevida.

5 CONCLUSÃO

Nesse estudo, observou-se uma diferença entre diferentes linhagens celulares de mama quanto à expressão de RNAm da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase, indicando que em diferentes tipos de câncer de mama tem-se uma expressão diferenciada dessas enzimas. Quando compara-se os níveis relativos de RNAm dessas ectonucleotidases com dados da literatura sobre a expressão proteica, tem-se a ideia de que ocorra algum mecanismo de regulação da expressão gênica, que podem ser mediado por miRNAs. Foram identificado miRNAs (hsa-miR-9-5p, hsa-miR-331-3p e hsa-miR-346 para NTPDase1; e hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-155-5p e hsa-miR-34a-5p para ecto-5'-nucleotidase) que aparentemente atuam regulando essas enzimas no CM.

Porém, são necessários novos estudos para compreender melhor o perfil de expressão e o papel fisiopatológico dessas ectonucleotidases nas linhagens mamárias.

REFERÊNCIAS

ABOUSAMRA, N. K. et al. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (E-NTPDase1/CD39) as a new prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, v. 56, n. 1, p.113-119, Jan. 2015.

ALIAGAS, E. et al. High Expression of Ecto-Nucleotidases CD39 and CD73 in Human Endometrial Tumors. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 8 p., 2014.

ALLARD, B.; TURCOTTE, M.; STAGG, J. Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer. **Expert opinion on therapeutics targets**, v. 18, n. 8, p. 863-881, Aug. 2014.

ARAB, S. et al. Increased efficacy of a dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine with adenosine receptor antagonist and CD73 inhibitor. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, Mar. 2017.

ARAÚJO, T. G. et al. A novel highly reactive Fab antibody for breast cancer tissue diagnostics and staging also discriminates a subset of good prognostic triple-negative breast cancers. **Cancer Letters (Print)**, v. 343, p. 275-285, Feb. 2014a.

ARAÚJO, T. G. et al. Dynamic dialog between cytokeratin 18 and annexin A1 in breastcancer: A transcriptional disequilibrium. *Acta Histochemica*, v. 116, n. 7, p. 1178-1184, Sep. 2014b.

BAO, R. et al. Adenosine and the adenosine A2A receptor agonist, CGS21680, upregulate CD39 and CD73 expression through E2F-1 and CREB in regulatory T cells isolated from septic mice. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, p. 969-975, 2016.

BERGAMIN, L. S. et al. Ectonucleotidases in Tumor Cells and Tumor-Associated Immune Cells: An Overview. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 10 p., July 2012.

BRACCO, P. A.; BERTONI, A. P. S.; WINK, M. R. NTPDase5/PCPH as a New Target in Highly Aggressive Tumors: A Systematic Review. **BioMed Research International**, v. 2014, 8 p., June 2014.

BURNSTOCK, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signaling. **Purinergic Signalling**, v. 11, p. 411–434, Aug. 2015a.

BURNSTOCK, G. Intracellular expression of purinoceptors. **Purinergic Signalling**, v. 11, p. 275–276, May. 2015b.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. **Exp Physiol**, v. 99, n. 1, p. 16–34, 2014.

BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v. 10, p. 529–564, Oct. 2014.

BURNSTOCK, G.; DALE, N. Purinergic signalling during development and ageing. **Purinergic Signalling**, v. 11, p. 277–305, May 2015.

BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling**, v. 9, p. 491–540, June 2013.

BURNSTOCK, G.; PELLEG, A. Cardiac purinergic signalling in health and disease. **Purinergic Signalling**, v. 11, p. 1–46, Dec. 2015.

CAI, X. Y. et al. Overexpression of CD39 and high tumoral CD39⁺/CD8⁺ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 11, p. 14757-1464, Nov. 2015.

CAI, X. Y. et al. Overexpression of CD39 in hepatocellular carcinoma is an independent indicator of poor outcome after radical resection. **Medicine**, v. 95, n. 40; p., Oct. 2016.

CAO, Y. et al. Hsa-miR-331-3p inhibits VHL expression by directly targeting its mRNA 3'-UTR in HCC cell lines. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 1, p. 77–82, 2015.

CAPPELLARI, A. R. et al. Characterization of ectonucleotidases in human medulloblastoma cell lines: ecto-5' NT/CD73 in metastasis as potential prognostic factor. **Plos One**, v.7, 10 p., Oct. 2012a.

CAPPELLARI, A. R. et al. Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. **Mol Cell Biochem**, v. 359, p. 315–322, Aug. 2012b.

CHANG, J. T. H. et al. Identification of MicroRNAs as Breast Cancer Prognosis Markers through the Cancer Genome Atlas. **PLoS One**, v. 11, n.12, 13 p., Dec. 2016.

CHANG, R. M. et al. miR-331-3p promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting PHLPP. **Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 1251-1263, Oct. 2014.

CHEN, B. et al. MicroRNA-346 functions as an oncogene in cutaneous squamous cell carcinoma. **Tumor Biol**, v. 37, n. 2, p. 2765-2771, 2015.

CHEN, Y. et al. MicroRNA-346 Mediates Tumor Necrosis Factor- α -induced Down-Regulation of Gut Epithelial Vitamin D Receptor in Inflammatory Bowel Diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 20, n. 11, p. 1910-1918. Nov. 2014.

DAUGAARD, I. et al. The association between miR-34 dysregulation and distant metastases formation in lung adenocarcinoma. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 102, n. 3, p. 484-491, Jun. 2017.

DEL CARMEN MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, V.; MÉNDEZ-MANCILLA, A.; PORTALES-PÉREZ, D. P. miRNAs in nutrition, obesity and cancer: the biology of miRNAs in metabolic disorders and its relationship with cancer development. **Molecular Nutrition & Food Research**, Jun. 2017.

DENG, X. et al. Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer. **Biomaterials**, v. 35, n. 14, p. 4333- 4344, May. 2014.

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

DOBSON, J. hsa-mir-30c promotes the invasive phenotype of metastatic breast cancer cells by targeting NOV/ CCN3. **Cancer Cell International**, 14 p., 2014.

DRURY, A. N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **J Physiol**, v. 68, n. 3, p. 213-237, 1929.

DUSHYANTHEN, S. et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **BMC Medicine**, 13 p., 2015.

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

FENG, L. et al. Purinergic modulation and CD39/ENTPD1 in cancer. **Frontiers in Anticancer Drug Discovery**, 2014.

FERRARI, D. et al. MicroRNAs Modulate the Purinergic Signaling Network. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 10, p. 905-918, Oct. 2016.

FERRARI, D.; MALAVASI, F.; ANTONIOLI, L. A Purinergic Trail for Metastases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 3, p. 277-290, Mar. 2017.

FILHO, J. C. M. R.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: Nova Classe de Reguladores Gênicos Envolvidos na Função Endócrina e Câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 6, Dez. 2006.

GHIRINGHELLI, F. et al. Production of Adenosine by Ectonucleotidases: A Key Factor in Tumor Immunoescape. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 9 p., 2012.

GIRIANELLI, V. R.; GAMARRA, C. J.; SILVA, G. A. Os grandes contrastes na mortalidade por câncer do colo uterino e de mama no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 48, n. 3, p. 459-467, 2014.

GUO, J. et al. miR-346 Up-regulates Argonaute 2 (AGO2) Protein Expression to Augment the Activity of Other MicroRNAs (miRNAs) and Contributes to Cervical Cancer Cell Malignancy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 51, Dec. 2015.

GUO, Y. et al. Kallistatin reduces vascular senescence and aging by regulating microRNA-34a-SIRT1 pathway. **Aging Cell**, p. 10, May. 2017.

GWAK, J. M. et al. MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 147, n. 1, p. 39-49, Aug. 2014.

HENNEL, R. et al. Release of monocyte migration signals by breast cancer cell lines after ablative and fractionated γ -irradiation. **Radiation Oncology**, v. 9, n.1, Mar. 2014.

IGARASHI, P. Regulação da Expressão Gênica. BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. **Fisiologia Médica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, p. 75-105.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). **Câncer de mama: é preciso falar disso**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Inca, 18p.: il. color., 2014.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015a. 168 p.: il. color.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015b. 122 p.: il. color.

JAFARI, N.; ABEDIANKENARI, S. MicroRNA-34 dysregulation in gastric cancer and gastric cancer stem cell. **Tumor Biology**, v. 39, n. 5, May. 2017.

JIANG, J. X.; RIQUELME, M. A.; ZHOU, J. Z. ATP, a double-edged sword in cancer. **Oncoscience**, v. 2, n. 8, p. 673-674, 2015.

JIANG, L.; HERMEKING, H. miR-34a and miR-34b/c suppress intestinal tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 77, n. 10, p. 2746-2758, May. 2017.

JIANG, Z. G. et al. Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ecto-nucleotidases in human plasma. **Purinergic Signalling**, v. 10, p. 611–618, Aug. 2014.

KASTL, L.; BROWN, I. SCHOFIELD, A. C. miRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 131, n. 2, p. 445–454, 2012.

KOSZALKA, P. et al. Specific Activation of A3, A2A and A1 Adenosine Receptors in CD73-Knockout Mice Affects B16F10 Melanoma Growth, Neovascularization, Angiogenesis and Macrophage Infiltration. **PLoS One**, v. 11, n. 3, Mar. 2016.

LEDDEROSE, C. et al. Adenosine arrests breast cancer cell motility by A3 receptor stimulation. **Purinergic signaling**, v. 12, n. 4, p. 673-685, Dec. 2016.

LEIVONEN, S. K. et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 1, p. 93-104, Feb. 2014.

LI, W. et al. Downregulation of $\beta 3$ integrin by miR-30a-5p modulates cell adhesion and invasion by interrupting Erk/Ets-1 network in triple-negative breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 3, p. 1155-1164, Mar. 2016.

LI, Y. et al. miR-9 regulates the multidrug resistance of chronic myelogenous leukemia by targeting ABCB1. **Oncology Reports**, v. 37, n. 4, p. 2193-2200, Apr. 2017.

LIU, J. et al. Expression of microRNA-30a-5p in drug-resistant and drug-sensitive ovarian cancer cell lines. **Oncology Letters**, v. 12, n. 3, p. 2065-2070, Sep. 2016.

LO NIGRO, C. et al. NT5E CpG island methylation is a favourable breast cancer biomarker. **British journal of cancer**, v. 107, n. 1, p.75-83, Jun. 2012.

LOI, S. et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **PNAS**, v. 110, n. 27, p. 11091–11096, Jul. 2013.

LU, E. et al. Enhanced miR-9 promotes laryngocarcinoma cell survival via down-regulating PTEN. **Biomed Pharmacotherapy**, v. 84, p. 608-613, Dec. 2016.

LUNAVAT, T. R. et al. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – Evidence of unique microRNA cargos. **RNA Biology**, v. 12, n. 8, p. 810-823, Aug. 2015.

MACFARLANE, L. A; MURPHY, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **Current Genomics**, v. 11, n. 7, 537-561, Nov. 2010.

MOHAMMADI-YEGANEH, S.; MANSOURI, A.; PARYAN, M. Targeting of miR9/NOTCH1 Interaction Reduces Metastatic Behavior in Triple-negative Breast Cancer. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 86, n. 5, p. 1185–1191, Nov. 2015.

MONTALBÁN DEL BARRIO, I. et al. Adenosine-generating ovarian cancer cells attract myeloid cells which differentiate into adenosine-generating tumor associated macrophages – a selfamplifying, CD39- and CD73-dependent mechanism for tumor immune escape. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 4, Aug. 2016.

MORRONE, F. B. **Estudo dos efeitos do ATP extracelular e das ecto-nucleotidases no crescimento de gliomas**. 2005. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Bioquímica) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MOULATLET, A. C. B. **MicroRNAs como biomarcadores no carcinoma pailífero de tireoide**: associação com mutações somáticas frequentes e significado biológico. 2014. 55 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

NEILSEN, P. M. et al. Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155. **Oncogene**, v. 32, n. 24, p. 2992-3000, Jun. 2013.

OUZOUNOVA, M. MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells. **BMC Genomics**, 15 p., Feb. 2013.

PUBMED HEALTH. **Breast Cancer Treatment**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032825/?report=printable>>. Acesso em: 9 setembro 2016.

QIAN, Y. et al. Extracellular ATP a New Player in Cancer Metabolism: NSCLC Cells Internalize ATP In Vitro and In Vivo Using Multiple Endocytic Mechanisms. **Molecular cancer research**, v. 14, n. 11, p. 1087-1096, Nov. 2016.

QU, K. et al. Circulating miRNA-21-5p as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer: evidence from comprehensive miRNA expression profiling analysis and clinical validation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 12 p., May. 2017.

QUEZADA, C. et al. 5'-ectonucleotidase Mediates Multiple-Drug Resistance in glioblastoma Multiforme Cells. **Journal of cellular physiology**, v. 228, n. 3, p. 602-608, Mar. 2013.

ROBERTSON, E. D. et al. The Oncogenic MicroRNA Hsa-miR-155-5p Targets the Transcription Factor ELK3 and Links It to the Hypoxia Response. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 13 p., Nov. 2014.

ROCKENBACH, L. et al. NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. **Purinergic Signalling**, v. 10, p. 421-430, Jan. 2014.

SCHIMID, S. et al. Altered purinergic signaling in the tumor associated immunologicmicroenvironment in metastasized non-small-cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 90, n. 3, p. 516-521, Dec. 2015.

SCHULER, P.J. et al. Adenosine metabolism of human mesenchymal stromal cells isolated from patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Immunobiology**, v. 222, n. 1, p. 66-74, Jan. 2017.

SELCUKLU, S. D. et al. MicroRNA-9 Inhibition of Cell Proliferation and Identification of Novel miR-9 Targets by Transcriptome Profiling in Breast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29516–29528, Aug. 2012.

SILVA, A. M. et al. Avaliação de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em pacientes com melanoma cutâneo. In: SEVINÁRIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 5., 2015, Chapecó. **Anais...** Chapecó, SC: Universidade Federal da Fronteira Sul, 2015, 2 p.

STAGG, J. et al. CD73-Deficient Mice Are Resistant to Carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 72, n. 9, 8 p., May 2012.

TAKENAKA, M. C.; ROBSON, S.; QUINTANA, F. J. Regulation of the T Cell Response by CD39. **Trends in immunology**, v. 37, n. 7, p. 427-39, Jul. 2016.

TEIXEIRA, L. **Câncer de mama, câncer de colo de útero**: conhecimentos, políticas e práticas. Rio de Janeiro: Outras Letras, 2015. 256 p., 21 cm.

TERP, M. G. et al. Anti-Human CD73 Monoclonal Antibody Internalization of CD73 Expressed on the Breast Cancer by Inducing Clustering and Inhibits Metastasis Formation in Human Surface of Cancer Cells. **Journal of immunology**, v. 191, n. 8, p. 4165-4173, Oct. 2013.

VILLAR, J. et al. PCPH/ENTPD5 Expression Enhances the Invasiveness of Human Prostate Cancer Cells by a Protein Kinase CD–Dependent Mechanism. **Cancer Res**, v. 67, n. 22, Nov. 2007.

VIRTANEN, S. S. et al. Adenosine Inhibits Tumor Cell Invasion via Receptor-independent Mechanisms. **American Association for Cancer Research**, Dec. 2014.

WAHID, F. et al. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 11, p. 1231–1243, Nov. 2010.

WANG, J. et al. Overexpressions of MicroRNA-9 and MicroRNA-200c in Human Breast Cancers Are Associated. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 28, n. 4, p. 283-288, May. 2013.

WANG, K. et al. Analysis of hsa-miR-30a-5p Expression in Human Gliomas. **Pathology oncology research**, v. 19, n. 3, p. 405-411, Jul. 2013.

WEI, Q. et al. A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. **Purinergic Signalling**, v. 9, p. 271–280, Jan. 2013.

WEIL, A. Regulação da expressão gênica. In: RODWELL, V. W. et al. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 30ª Edição. Porto Alegre: AMGH, 2017, p. 428-450.

YAN, H.L. et al. miR-346 promotes migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting BRMS1. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 30, n. 12, p. 602-607, Dec. 2016.

YANG, F. et al. MiR-346 promotes the biological function of breast cancer cells by targeting SRCIN1 and reduces chemosensitivity to docetaxel. **Gene**, v. 600, p. 21-28, Feb. 2017.

YANG, X. et al. Tiamulin inhibits breast cancer growth and pulmonary metastasis by decreasing the activity of CD73. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, 12 p., Apr. 2017.

YIN, Q. et al. MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5295–5306, Jun. 2008.

YU, F. et al. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. **Oncogene**, v. 29, n. 29, p. 4194-4204, Jul. 2010.

ZAWISTOWSKI, J. S. et al. MicroRNA 9-3p Targets 1 Integrin To Sensitize Claudin-Low Breast Cancer Cells to MEK Inhibition. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 11, p. 2260–2274, Jun. 2013.

ZHANG, B. et al. High expression of CD39/ENTPD1 in malignant epithelial cells of human rectal adenocarcinoma. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9411-9429, Dec. 2015.

ZHANG, N. et al. MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin. **Oncogene**, v. 33, n. 24, p. 3119-3128, Jun. 2014.

ZHANG, T. A Downmodulated MicroRNA Profiling in Patients with Gastric Cancer. **Gastroenterology Research and Practice**, 8 p., 2017.

ZHAO, D.; SUI, Y.; ZHENG, X. miR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HER2 through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways in colorectal cancer. **Oncology Reports**, v. 35, n. 2, p. 1075-1082, Feb. 2016.

ZHOU, J. Z. et al. Differential Impact of Adenosine Nucleotides Released by Osteocytes on Breast Cancer Growth and Bone Metastasis. **Oncogene**, v. 34, n. 14, p. 1831–1842, Apr. 2015.