

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Karen Freitas Santos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA *UNCARIA TOMENTOSA* SOB O
SISTEMA PURINÉRGICO EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

**Santa Maria, RS
2016**

Karen Freitas Santos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA *UNCARIA TOMENTOSA* SOB O SISTEMA
PURINÉRGICO EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas.**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Vera Maria Melchiors Morsch

**Santa Maria, RS
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Karen Freitas
Avaliação do efeito da Uncaria tomentosa sob o sistema purinérgico em linhagens de câncer de mama / Karen Freitas Santos.- 2016.
120 p.; 30 cm

Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Câncer 2. Ectonucleotidases 3. Adenosina 4. Uncaria tomentosa I. Morsch, Vera Maria Melchiors II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Karen Freitas Santos. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: karenf1003@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA *UNCARIA TOMENTOSA* SOB O SISTEMA
PURINÉRGICO EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

elaborada por
Karen Freitas Santos

como requisito parcial para obtenção do título de
Doutora em Ciências Biológicas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Vera Maria Melchiors Morsch, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Francieli Moro Stefanello, Dra. (UFPEL)

Elizandra Braganhol, Dra. (UFCSPA)

Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)

Vânia Lucia Loro, Dra. (UFSM)

**Santa Maria, RS
2016**

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada a minha família, a qual muitas vezes ficou em segundo plano para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Em oração, sempre agradei e agradeço todos os dias a Ele, Deus! Grata pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Grata, também, aos meus guias espirituais, os quais sempre me mostraram o melhor caminho, influenciando-me para as melhores escolhas.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, que me encorajaram e incentivaram sempre e, de uma maneira especial, agradeço:

- a minha orientadora, Professora Vera Morsch pela oportunidade, por aceitar que eu trabalhasse durante todo o curso, mesmo sabendo que o meu rendimento poderia não ser o mesmo do que se tivesse dedicação exclusiva. Obrigada pela confiança em mim depositada, pelo carinho, pelo incentivo e pelos conhecimentos compartilhados ao longo destes anos, és uma excelente profissional;

- a Professora Maria Rosa Chitolina Schetinger, pessoa de conhecimento admirável, carinhosa e excelente profissional;

- a minha querida AMIGA e MÃE de coração, Maria do Carmo Araújo, minha fonte de admiração e inspiração pelo exemplo de profissionalismo e amor em tudo que faz, bem como por estar sempre presente na minha vida pessoal e profissional;

- aos meus pais Marlene e Marino, pela benção da vida; principalmente a minha querida mãe, seu AMOR foi fundamental nesses anos de doutorado;

- ao meu irmão, Tiago, o meu melhor amigo, o meu porto seguro, pelos incentivos, conselhos e apoio incondicional;

- a minha cunhada Líliana pela amizade, cumplicidade e carinho, cunhada que considero uma irmã;

- aos meus sobrinhos, Lavínia e Víctor, que mesmo ainda não tendo a mínima noção do que se trata um doutorado, renovam as minhas energias ao me receberem com os sorrisos e os abraços mais sinceros e puros que alguém pode receber. Um amor genuíno que faz acreditar que a vida é bela e que vale a pena vivê-la;

- ao meu Tio Trajano, in memoriam, que apesar do seu jeito “durão” tinha um coração enorme, deixando belos ensinamentos e valores, os quais levarei comigo por todos os dias da minha vida;

- aos meus amigos, em especial o Bruno Vizzotto, Isabel Roggia e Máisa Carvalho, que perdoaram minha ausência e sempre me incentivaram;

- ao meu grande amigo, Jessié, por todo carinho, cumplicidade e pelo comprometimento em ajudar-me no desenvolvimento deste trabalho;

- aos colegas de Laboratório de Enzimologia, em especial, ao Fabiano Carvalho e a Michelli Pillat pela amizade, ajudas e trocas de conhecimentos valiosos;

- a querida amiga Patrícia Brites pela lealdade e conhecimentos transmitidos;

- ao Professor Paulo Bayard Gonçalves, por aceitar a parceria na pesquisa e ceder seu laboratório para parte das atividades;

- ao Werner Glanzner e ao Vitor Rissi, amigos que fiz durante os experimentos e serei eternamente grata por tudo e, com os quais, aprendi muito;

- à URI- Frederico Westphalen, pelo incentivo para realização do doutorado;

- aos colegas de trabalho, pelo incentivo, amizade e carinho ao longo destes anos, em especial minha colega, amiga e comadre Ana Cristina Stein, pela lealdade e incentivo incondicional na realização deste trabalho;

- aos fomentos de pesquisa, pelos recursos financeiros, e ao Herbarium Laboratório Botânico, pela doação do extrato seco de *Uncaria tomentosa*;

- ao PPG de Bioquímica Toxicológica pela oportunidade, especialmente à Dica, nossa secretária.

- às professoras avaliadoras, as quais aceitaram dedicar parte do seu tempo em prol de uma leitura detalhada deste trabalho;

- à UFSM, universidade com excelente qualidade de ensino.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA *UNCARIA TOMENTOSA* SOB O SISTEMA PURINÉRGICO EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

AUTORA: Karen Freitas Santos

ORIENTADORA: Dra. Vera Maria Melchiors Morsch

A *Uncaria tomentosa* (UT), ou unha de gato, é uma planta arbustiva, nativa das Américas Central e do Sul, rica em alcaloides oxindólicos e seus precursores, os alcaloides indólicos. A esta planta já foram atribuídos inúmeras atividades biológicas como: imunoestimulante, anti-inflamatória, indutora de apoptose e inibição da proliferação tumoral em linhagens de células tumorais. O câncer de mama, a neoplasia mais comum entre as mulheres, normalmente é tratado por cirurgia, quimioterapia, hormonioterapia ou radioterapia. Dentre as opções de tratamento, a quimioterapia, por seus efeitos citotóxicos, resulta em alguns efeitos adversos. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da UT na atividade das ectonucleotidases, as quais estão envolvidas na progressão tumoral. Para avaliar este efeito, utilizamos duas linhagens de câncer de mama: uma que não expressa receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), MDA-MB-231, caracterizada como pior prognóstico e outra linhagem, a MCF-7, que expressa esses receptores e, na maioria dos casos, responde bem aos tratamentos. Em um primeiro momento comprovamos o efeito antiproliferativo do extrato hidro alcoólico de UT, por metodologias que avaliam a viabilidade celular, azul de trypan e atividade das desidrogenases mitocondriais (MTT). Após, verificamos as atividades das ectonucleotidases. Onde pudemos constatar que os extratos de UT nas concentrações 250 e 500 µg/mL não alteram a hidrólise de ATP e ADP na linhagem MDA-MB-231, já na linhagem MCF-7, embora sem alterações significativas na hidrólise do ATP, o extrato de UT 250 e 500 µg/mL reduziu significativamente a hidrólise do ADP. Entretanto, o grupo UT 500µg/mL associado a doxorrubicina, mostrou um aumento na atividade das ecto-NTPDases, utilizando o ATP e ADP como substratos, reduzindo desta forma os níveis de ATP no meio extracelular. Os extratos de UT, em ambas as concentrações, foram capazes de inibir a atividade da ecto-5'-nucleotidase em ambas as linhagens celulares (MDA-MB-231 e MCF-7). Assim como, quando se associou o tratamento a base de UT, nas duas concentrações, com a doxorrubicina nas células MDA-MB-231 e UT 250 µg/mL associada ao tamoxifeno nas células MCF-7, também observamos uma significativa redução da atividade da ecto-5'-nucleotidase. Verificamos um aumento na expressão da CD39 apenas nos grupos UT 250 µg/mL e UT 250 µg/mL associada a doxorrubicina, das células MDA-MB-231. Enquanto que a expressão da CD73 não sofreu alterações em sua expressão em nenhum dos tratamentos aplicados em ambas às linhagens celulares. A expressão dos receptores do tipo A1 aumentou com os tratamentos a base de UT enquanto que a expressão do P2X7 diminuiu na linhagem MDA-MB-231. Podemos concluir que a UT é capaz de modular a atividade de enzimas do sistema purinérgico, principalmente a ecto-5'-nucleotidase. Este efeito pode reduzir os níveis de adenosina no meio extracelular, molécula esta que favorece a proliferação tumoral. Além disso, o extrato de UT altera a expressão dos receptores purinérgicos, podendo assim, juntamente com a modulação da atividade enzimática, minimizar o processo de invasão tumoral.

Palavras-chave: Câncer. Ectonucleotidases. Adenosina. *Uncaria tomentosa*.

ABSTRACT

EVALUATE EFFECT OF *UNCARIA TOMENTOSA* UNDER PURINERGIC SYSTEM IN BREAST CANCER LINES

AUTHOR: KAREN FREITAS SANTOS
ADVISOR: PROF^a DR^a VERA MARIA MELCHORS MORSCH

The *Uncaria tomentosa* (UT), or cat's claw, is a perennial plant, native to Central and South America, rich in oxindole alkaloids and their precursors, indole alkaloids. For this plant have been assigned many biological activities such as: immunostimulating, anti-inflammatory, inducing apoptosis and inhibition of tumor proliferation in cancer cell lines. Breast cancer, the most common cancer among women, is usually treated by surgery, chemotherapy, hormone therapy or radiation. Among the treatment options, chemotherapy, which by their cytotoxic effects, result in some adverse effects. Considering the above, the objective of this study was to evaluate the effect of UT in the activity of ectonucleotidase, which are involved in tumor progression. To evaluate this purpose, we used two breast cancer cell lines: one that not express estrogen receptor (ER) and progesterone (PR), MDA-MB-231, characterized as poor prognosis and another line, the MCF-7 that expresses these receptors and, in most cases, responds well to treatment. First we proved the antiproliferative effect of alcoholic extract of hydro UT, by trypan blue and MTT methods. Next we evaluate the activities of ectonucleotidase, when we observed that the UT extracts in concentrations of 250 and 500 µg/mL did not alter the hydrolysis of ATP and ADP in MDA-MB-231 cells, already the MCF-7 cells, but no significant alterations in ATP hydrolysis, the extract UT 250 and 500 µg/mL significantly reduced the hydrolysis of ADP. However, the UT 500 µg/mL associated with doxorubicin group showed an increase in the activity of ecto-NTPDase using ATP and ADP as substrates, thereby reducing the levels of ATP in the extracellular medium. UT extracts, at both concentrations, were able to inhibit the activity of ecto-5'-nucleotidase in both cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7). As well as, when were associated the UT (at both concentration) with doxorubicin on MDA-MB-231 cells, and UT 250 µg/mL associated with tamoxifen on MCF-7 cells observed a significant reduction of the activity of ecto-5'-nucleotidase. We found an increased expression of CD39 in UT 250 µg/mL and UT 250 µg/mL associated doxorubicin groups in MDA-MB-231 cells. While the expression of CD73 did not change in expression in any of the treatments applied to cell lines. The expression of A1 receptors increased with the extract UT treatments whereas decreased expression of P2X7 on MDA-MB-231 line after the treatment. We conclude that UT is capable of modulating the activity of purinergic system enzymes, especially ecto-5'-nucleotidase. This effect can reduce adenosine in the extracellular environment, this molecule favors tumor proliferation. Furthermore, the UT extract alters the expression of purinergic receptors which together with the modulation of enzymatic activity minimize the process of tumor invasion.

Keywords: Cancer. Ectonucleotidases. Adenosine. *Uncaria tomentosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo hipotético da progressão do tumor mamário.....	29
Figura 2	Receptores purinérgicos localizados na superfície celular e o catabolismo dos nucleotídeos no meio extracelular pelas ectonucleotidases	37
Figura 3	Topografia de membrana das ectonucleotidases.....	38
Figura 4	Membros da família das enzimas Ecto-NTPDases.....	39
Figura 5	Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana.....	41

ARTIGO CIENTÍFICO I

Figure 1	HPLC-Fingerprint analysis of dry extract from <i>Uncaria tomentosa</i> and cellular viability.....	59
Figure 2	NTPDase activity in the MDA-MB-231 cells.....	61
Figure 3	Expression of CD39 and CD73 in MDA-MB-231 cells.....	63
Figure 4	Expression profiles of the A1 receptor (A) and P2X7 receptor in the MDA-MB-231 breast cancer cells detected by western blotting (WB).....	64

MANUSCRITO I

Figure 1	HPLC-Fingerprint analysis of dry extract from <i>Uncaria tomentosa</i>	92
Figure 2	Effects of <i>Uncaria tomentosa</i> (UT, 250 and 500 µg/ml), estradiol (EST, 1µM) and tamoxifen (TAM, 10 µM) on trypan blue negative cells (A and B) and MTT reduction (C and D) in the MCF-7 cell viability.....	93
Figure 3	Effects of <i>Uncaria tomentosa</i> (UT, 250 and 500 µg/ml), estradiol (EST, 1µM) and tamoxifen (TAM, 10 µM) on 5'-nucleotidase activity using using ATP (A and B) and ADP (C and D) as substrate.....	94
Figure 4	Effects of <i>Uncaria tomentosa</i> (UT, 250 and 500 µg/ml), estradiol (EST, 1µM) and tamoxifen (TAM, 10 µM) on NTPDase activity using AMP (A and B) as substrate.....	95
Figure 5	Effects of <i>Uncaria tomentosa</i> (UT 250 µg/ml), estradiol (EST, 1µM) and tamoxifen (TAM, 10 µM) on CD39+ (A) and CD73+ (B) cells expression. (C) Dot blot of CD 39+ and CD73+ expression in MCF-7 cells.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais tipos de alcaloides da planta <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC	25
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
DMEM	Meio Dulbecco Eagle modificado
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FBS	Soro fetal bovino
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
HIF-1α	Fator indutor de hipóxia 1 α
MKI-67	Gene de proliferação da proteína KI-67
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium]
Pi	Fosfato inorgânico
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SERM	Modulador seletivo de receptor de estrogênio
TGF-alfa	Fator de crescimento transformante alfa
UT	<i>Uncaria tomentosa</i>
UTP	Glicose-1-fosfato uridililtransferase

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1	<i>UNCARIA TOMENTOSA</i>	25
2.2	CÂNCER	27
2.2.1	Câncer de mama	27
2.2.2	Marcadores moleculares dos tumores de mama	30
2.2.3	Tratamentos para o câncer de mama	33
2.2.4	Linhagens celulares de câncer de mama	34
2.3	SISTEMA PURINÉRGICO	35
2.3.1	Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares e os receptores purinérgicos	35
2.3.2	Ectonucleotidasas	37
2.3.2.1	<i>Ecto-NTPDases</i>	38
2.3.2.2	<i>Ecto-5'-nucleotidase</i>	40
2.3.3	Sistema purinérgico e os tumores	41
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	47
4.1	ARTIGO CIENTÍFICO I	47
4.2	MANUSCRITO I	77
5	DISCUSSÃO	97
6	CONCLUSÕES	107
	PERSPECTIVAS	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1 APRESENTAÇÃO

No item **REFERENCIAL TEÓRICO** está descrito uma revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta tese, seguido pelo item **OBJETIVOS**, o qual apresenta os objetivos geral e específicos.

Os Materiais e Métodos, Resultados e Discussão são encontrados no item **PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS** e representam integralmente esta tese.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final deste trabalho, apresentam as interpretações gerais sobre as publicações científicas contidas neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se apenas às citações que aparecem nos itens **REFERENCIAL TEÓRICO** e **DISCUSSÃO** desta tese, já que as referências utilizadas na elaboração dos artigos estão mencionadas nos mesmos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 UNCARIA TOMENTOSA

A *Uncaria tomentosa* (UT) (Willd.) DC ou “Unha de Gato” é uma planta arbustiva natural das Américas Central e do Sul, pertencente à família *Rubiaceae* (LAUS et al., 1997; NOWAKOWSKA et al., 2009). Os extratos aquosos das cascas do caule e das raízes da planta são utilizados com finalidade terapêutica para doenças inflamatórias, reumatismo, artrite, doenças cardíacas e o câncer (LAUS et al., 1997; HEITZMAN et al., 2005).

Existem inúmeras espécies do gênero *Uncaria*, mas a UT é aquela na qual já foi identificado o maior número de compostos (HEITZMAN et al., 2005). Entre os diversos constituintes químicos já caracterizados desta planta, destacam-se os alcaloides oxindólicos (SANDOVAL et al., 2002) que são reconhecidos como os marcadores fitoquímicos desta espécie por estarem associados a várias de suas ações farmacológicas (HEITZMAN et al., 2005; KEPLINGER et al., 1999). Juntamente com os alcaloides oxindólicos, também se destaca a presença dos seus precursores, os alcaloides indólicos (Tabela 1), sendo que alguns destes são conhecidos desde a década de 70 (KEPLINGER et al., 1999; PHILLIPSON et al., 1978).

Tabela 1 – Principais tipos de alcaloides da planta *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC

	Alcaloides pentacíclicos	Alcaloides tetracíclicos
Alcaloides oxindólicos	Uncarina C Uncarina E Speciofilina Uncarina F Mitrafilina Isomitrafalina	Rincofilina Isorincofilina Corinoxeína Isocorinoxeína
Alcaloides indólicos	Akuamigina Tetraidroalstonina isoajmalicina	Hirsutina Diidrocorinanteína Hirsuteína Corinanteína

Fonte: Adaptado de Keplinger et al. (1999).

Além da presença dos alcaloides, as análises fitoquímicas indicam a presença de outros compostos como: glicosídeos de ácido quinóico, flavonoides, triterpenos

pentacíclicos, proantocianidinas entre outras substâncias presentes em menores concentrações (AQUINO et al., 1991-1997).

Muitos estudos já descreveram atividades biológicas para numerosos extratos e frações de UT, incluindo atividade anti-inflamatória (AQUINO et al., 1991; SANDOVAL et al., 2002), imunomodulatória (KEPLINGER et al., 1999; WURN et al., 1998), atividade imunomodulatória (LEMAIRE et al., 1999), bem como efeito um indutor de apoptose e inibição da proliferação tumoral em linhagens de células tumorais (DE MARTINO et al., 2006; SHENG et al., 1998; 2002).

Para Heitzman e col (2005) os efeitos biológicos encontrados para esta planta estão associados aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, assim como outros pesquisadores afirmam esta relação (BACHER et al., 2005; GARCIA PRADO et al., 2007; MILLER et al., 2001; SANDOVAL et al., 2000). Entretanto, outros estudos demonstraram um efeito sinérgico da combinação dos compostos desta planta, como por exemplo, para o efeito anti-inflamatório (REINHARD et al., 1999; RIZZI et al., 1993). Dreifuss e col (2010, 2013) relataram uma expressiva atividade antitumoral e antioxidante do extrato hidroalcolólico de UT mostrando que, os alcaloides oxindólicos presentes no extrato não são os únicos responsáveis pelos efeitos biológicos, ao menos no modelo tumoral *in vivo* de carcinossarcoma Walker-256.

Atualmente, é crescente a atenção que está sendo dada para o potencial anti-neoplásico de UT. De fato, há vários extratos e compostos derivados desta planta que alteram ou inibem totalmente o crescimento e proliferação de inúmeras linhagens tumorais, incluindo glioma (GARCIA PRADO et al., 2007), leucemia promielocítica (PILARSKI et al., 2007; SHENG et al., 1998), linhagens de câncer de mama, MCF-7 (RIVA et al., 2001).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando a UT, pode-se observar um aumento significativo nas contagens de neutrófilos em camundongos que, previamente, foram submetidos a um quadro de neutropenia induzida por ifosfamida (FARIAS et al., 2011). Ainda, através de um ensaio clínico realizado com mulheres diagnosticadas com câncer de mama, estágio II, o uso de 300mg de extrato seco de UT por dia foi capaz de recuperar a neutropenia induzida pela quimioterapia (ARAÚJO et al., 2012).

Os medicamentos fitoterápicos estão sendo utilizados cada vez mais no tratamento de inúmeras patologias, inclusive do câncer. Estes produtos têm como componentes terapeuticamente ativos, plantas ou derivados vegetais, não podendo ter em sua composição substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem associações destas com extratos vegetais (OMS, 2000). Em 1978 a OMS passou a reconhecer o uso de medicamentos fitoterápicos com finalidade profilática, curativa e paliativa.

A UT já é um medicamento fitoterápico produzido pelo laboratório farmacêutico Herbarium, localizado no estado do Paraná, referência em fitoterápicos no Brasil desde 1985.

Os pacientes com câncer representam um nível excepcionalmente elevado de consumidores de fitoterápicos, como uma medida de terapia alternativa para a doença (ERNST et al., 1998), tanto os pacientes em quimioterapia paliativa ou curativa relatam utilizar fitoterápicos, no último caso usam fitoterápicos muito mais frequentemente para atenuar os efeitos adversos da quimioterapia (ENDGAL; NILSEN, 2009).

2.2 CÂNCER

Conhecido por ser uma das doenças com maiores taxas de mortalidade no mundo, o câncer é caracterizado por alterações dinâmicas no genoma das células, acarretando um crescimento celular incontrolável, podendo resultar na invasão de tecidos adjacentes e disseminação de células tumorais para outros tecidos (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). Já é considerado um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, quando se espera para 2025 mais de 20 milhões de casos novos no mundo (BRASIL, 2015).

2.2.1 Câncer de mama

Segundo dados do projeto Globocan/larc de 2012, o câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo, e na América Latina é o mais incidente em mulheres. No Brasil, estimativas feitas para o ano de 2016, apontam a ocorrência de 57.960 casos novos de câncer de mama. Para o Estado do Rio

Grande do Sul, as estimativas para o ano de 2016 são de 5.210 novos casos deste tipo de neoplasia (BRASIL, 2015).

Trata-se de uma neoplasia de etiologia variada e complexa, sendo influenciada tanto por fatores endógenos, como taxas hormonais e predisposição genética, quanto por fatores exógenos, como a dieta, consumo de álcool, contraceptivos orais, entre outros (ELLSWORTH et al., 2007; RADICE et al., 2003).

A idade permanece como um dos principais fatores de risco, quando mais de 80% dos casos de câncer de mama acometem mulheres com idade igual ou superior a 50 anos, e somente 5% dos casos ocorrem em mulheres com menos de 30 anos de idade (BUSHATSKY et al., 2015; OLDENBURG et al., 2007). Também, relacionam-se como fator de risco os hormônios sexuais endógenos relacionados ao ciclo menstrual, como menarca precoce, antes dos 12 anos de idade, e menopausa tardia, após os 55 anos (BUSHATSKY et al., 2015; DUMITRESCU et al., 2005). Este efeito é consequência do maior tempo de exposição ao estrogênio endógeno, um ativador da proliferação das células do tecido mamário, ao longo da vida da mulher. Adicionalmente, acredita-se que o estrogênio possua uma atividade anti-apoptótica nas células expostas a este hormônio, impedindo a morte celular programada das células neoplásicas (NAROD et al., 2004).

O tecido mamário é formado por um estroma fibroso, rico em tecido adiposo, e por ductos que iniciam nos mamilos e vão até os lóbulos. O estroma deste tecido é formado por vários tipos celulares, incluindo fibroblastos, células do sistema imune, adipócitos e vasos sanguíneos (HENNIGHAUSEN et al., 2005). Na região dos ductos há uma camada epitelial interna e, externamente, uma camada mioepitelial que separa o parênquima mamário do estroma (PAGUIRIGAN et al., 2006).

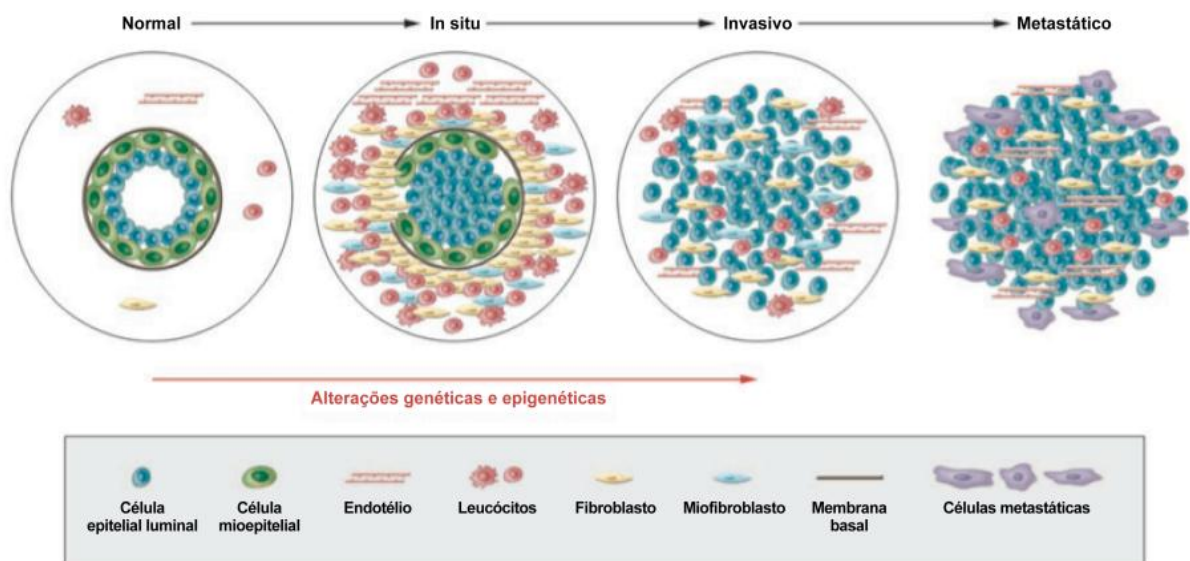
Durante o processo de carcinogênese do tecido mamário, vão ocorrendo mutações genéticas, bem como proliferação, crescimento celular e uma progressiva conversão de células normais em células neoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os tecidos em condições normais controlam a produção e liberação de fatores que promovem o crescimento e proliferação celular. Já o tecido tumoral, principalmente devido às alterações genéticas, provoca uma desregulação destes sinais, produzindo muitos fatores de crescimento (CHENG et al., 2007). Além disto, as células malignas tornam-se insensíveis as moléculas inibidoras do crescimento

(BURKHART et al., 2008), e resistentes a apoptose bem como potencializam a replicação celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Clinicamente esta neoplasia pode apresentar-se de três formas diferentes: situação onde o tumor permanece apenas no tecido mamário, conhecido como carcinoma *in situ*; carcinoma invasivo, quando as células tumorais invadem o tecido adjacente; e quando as células tumorais atingem outro órgão, é conhecido como o câncer metastático (ALLRED et al., 2001).

A Figura 1 mostra hipoteticamente esta progressão tumoral de forma esquemática do tecido normal, e em carcinomas, invasivo e metastático. Em condições normais, os ductos mamários são compostos por membrana basal e uma camada de células epiteliais e mioepiteliais, e o estroma é formado por leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. Nos casos de carcinoma *in situ*, as células mioepiteliais são alteradas geneticamente e epigeneticamente e, seu número diminui, provavelmente devido à degradação da membrana basal. No mesmo momento, o número de células do estroma e células epiteliais aumenta. A diminuição de células mioepiteliais e da membrana basal resulta em carcinoma invasivo, no qual as células invadem o tecido adjacente, podendo migrar para órgãos distantes, levando à metástase (POLYAK, 2007).

Figura 1 – Modelo hipotético da progressão do tumor mamário



Fonte: Adaptado de Polyak (2007).

Além de ser considerada uma doença de etiologia variada, o câncer de mama apresenta características heterogêneas, com variações genéticas, moleculares e histopatológicas, que influenciam diretamente no tratamento e na resposta clínica (POLIAK, 2011; VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). São tumores sólidos, podendo ter origem nas glândulas mamárias, conhecido como carcinoma lobular, ou então, nos ductos, chamado então de carcinoma ductal (TIEZZI, 2009).

2.2.2 Marcadores moleculares dos tumores de mama

Os tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e distintas respostas terapêuticas (CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009). Estas diferenças podem ser em parte justificadas pelos diferentes subtipos moleculares do carcinoma mamário (PEROU et al., 2000). Em razão disto, em 2001, foi estabelecida uma nova classificação molecular baseada no perfil de expressão gênica destes tumores. De acordo com o perfil molecular estabelecido por Sorlie e col (2001), foram definidos cinco subgrupos de carcinoma mamário: luminal A, luminal B, HER2-positivo, basal-*like* e normal breast-*like* (SORLIE et al., 2001). O uso do termo “basal” é dado a estas células neoplásicas, pois elas expressam genes usualmente expressos em células basais e/ou mioepiteliais da mama normal (TURNER; REIS-FILHO, 2006). Os carcinomas basais são caracterizados por um mau prognóstico (RAKHA et al., 2010) e alto grau histológico. Em 2009, Herschkowitz e col identificaram um novo sub-tipo, o *Claudin-low*.

O subgrupo associado a um bom prognóstico é o luminal A e representa cerca de 60% dos casos de carcinoma de mama (WEIGEL; DOWSETT, 2010). É considerado um tumor de baixo grau histológico com alta expressão de receptores de estrogênio (RE) e/ou progesterona (RP) com ausência do fator de crescimento epidermal tipo 2 (HER2 ou EerB2). O segundo subtipo, luminal B, apresenta um pior prognóstico em relação ao subtipo A, expressa tanto o RE quanto o HER2, assim como outros genes que estão relacionados com a proliferação celular como o MKI67 (Ki-67) (SORLIE et al., 2001; 2004; VODUC et al., 2010).

O fenótipo luminal foi denominado desta forma porque as neoplasias RE positivas expressavam outros genes que, também, são expressos por células

luminais da mama, sendo assim, pode-se supor que os carcinomas de mama RE positivo poderiam ter origem a partir deste tipo celular (PEROU et al., 2000). Embora ambos expressem receptores hormonais, o subtipo luminal A tem uma expressão maior de genes associados aos receptores de estrógeno e uma expressão menor de genes proliferativos do que os carcinomas do subtipo luminal B (SORLIE et al., 2001; 2004).

O subtipo HER2-positivo é considerado o pior prognóstico entre os subgrupos, superexpressando o receptor HER2, mas com ausência dos receptores hormonais RE e RP. Este subtipo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais (SORLIE et al., 2001). Embora, tenha ausência dos receptores hormonais, responde bem a drogas que bloqueiam a atividade do HER2 (HENRY; HAYES, 2012; ROSS et al., 1999). De forma geral, mulheres com carcinoma invasivo HER2-positivo possuem uma doença agressiva com maior probabilidade de recidiva, e sobrevida global menor, quando se compara a mulheres com HER2 negativas (HENRY; HAYES, 2012).

O subgrupo basal-*like*, é conhecido também como o triplo-negativo pelo fato de não expressar os receptores hormonais RE, RP e o HER2. As células basais/mioepiteliais apresentam características normais, expressando normalmente o fator de crescimento epidérmico (EGFR) (SORLIE et al., 2004). Porém é considerado o de pior prognóstico, o qual não possui um alvo terapêutico definido (SORLIE et al., 2001). Muito se discute a respeito do perfil triplo-negativo que, de todos os perfis, é o que possui o comportamento clínico mais agressivo e é encontrado em aproximadamente 15% a 20% dos carcinomas invasivos (FOULKES et al., 2010).

O subgrupo, normal breast-*like*, possui perfil de expressão comum às células normais, também é considerado um triplo-negativo, porém apresenta crescimento lento e é conhecido por ser pouco agressivo. Apesar das características não muito claras, representa um bom prognóstico (SORLIE et al., 2001; 2004).

O último subgrupo identificado, o *claudin-low*, é caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com as junções celulares oclusivas e glicoproteínas de adesão célula-célula como as claudinas 3, 4 e 7 e, a E-caderina (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Apresenta um padrão característico de triplo-negativo não basal e, ainda, não possui perfil de expressão de proteínas definido

para a sua caracterização e nem terapêutica. É normalmente um carcinoma do tipo ductal invasor, com alta frequência de diferenciação metaplásica e medular (PRAT et al., 2010).

O estrógeno é um hormônio sexual feminino que possui um papel fundamental no câncer de mama ao induzir o crescimento, a divisão e a proliferação das células do tecido mamário, o que acaba aumentando o potencial de alterações genéticas que levam ao desenvolvimento desta neoplasia (ROBLES; GALANIS, 2002). O estrogênio exerce seu efeito carcinogênico através de mecanismos dependentes de receptores de estrógeno e independentes de receptores de estrógeno (BHAT et al., 2003). A via dependente de receptor de estrógeno envolve a ativação do RE por estrógenos, conduzindo a expressão de genes responsivos a este hormônio, assim como a estimulação do crescimento e proliferação celular. Além disto, o estrogênio promove a expansão de células neoplásicas responsivas a ele, resultando em acúmulo de dano genômico (MENSE et al., 2008; YAGER et al., 2006). Já pela via independente de RE, o câncer de mama induzido por ação hormonal está envolvido na geração de metabólitos de estrógeno genotóxicos, que são altamente reativos e lesam o DNA (YAGER et al., 2006).

O status dos receptores de estrógeno e progesterona em tumores de mama são importantes fatores preditivos, pois funcionam como marcadores de resposta do tumor a terapias adjuvantes (PAYNE et al., 2008). O tamoxifeno, um fármaco utilizado em terapias endócrinas, é um modulador seletivo do receptor de estrógeno e inibe a ligação deste ao estradiol, interrompendo uma série de mecanismos que regulam a replicação e proliferação celular. Este fármaco é indicado em casos de doença metastática, bem como no tratamento adjuvante (pós-operatório) de pacientes com tumor em fase inicial ou avançada, em casos onde o paciente possui linfonodos acometidos ou livres de tal doença, e em casos de pacientes com carcinoma ductal *in situ* (DINH et al., 2007; FOLGUEIRA et al., 2005)

A proliferação celular também está relacionada com o receptor de progesterona, podendo ser expresso tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos. A perda de expressão de RP e RE constitui um potencial mecanismo de resistência à terapia hormonal e, em ambos os casos, a inativação da expressão destes genes por mecanismos epigenéticos tem um importante papel neste contexto (LIU et al., 2004).

2.2.3 Tratamento para o câncer de mama

Como já mencionado o câncer de mama é uma patologia com características heterogêneas e com uma elevada variabilidade histológica. De forma geral, a abordagem terapêutica para este tipo de neoplasia consiste de cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia. A quimioterapia e a hormonioterapia são terapias sistêmicas que atuam como adjuvantes, desempenhando importante papel na atuação sobre células tumorais remanescentes (circulantes e/ou isoladas) com o objetivo de diminuir a recorrência do câncer de mama (GREENBERG et al., 2011). O tratamento sistêmico adjuvante pode reduzir o risco de recorrência da doença nos primeiros cinco anos, resultando assim numa redução substancial nas taxas de mortalidade em quinze anos de acompanhamento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2011).

As variáveis com maior impacto na definição de risco individual são o tamanho do tumor e o envolvimento linfonodal, mas a avaliação dos RE, RP e HER2 é fundamental para a classificação das neoplasias mamárias, bem como na orientação para a escolha do tratamento (DANOVA et al., 2011). Além das variáveis histopatológicas, algumas condições clínicas individuais, tais como a presença de co-morbidades, uso de outros medicamentos, até mesmo, estilo de vida, talvez possam afetar a resposta ou a tolerabilidade à quimioterapia, repercutindo na sobrevida global de pacientes com câncer (BRECCIA et al., 2011; JIRALES PONG et al., 2009).

Os tumores positivos para RE, os quais têm crescimento dependente de estímulo hormonal, são eficazmente tratados com terapia antiestrogênica, seja pelo uso de antagonistas do RE, como o tamoxifeno, ou então pela inibição da síntese endógena, com o uso de inibidores da aromatase (anastrozol e letrozol). Os inibidores de aromatase são uma opção ao tamoxifeno para pacientes em pós-menopausa (SAAD et al., 2002) e os protocolos clínicos sugerem que, após cinco anos de terapia com tamoxifeno, as pacientes sejam transferidas para um inibidor de aromatase (LIN; WINER, 2008).

Os tumores negativos para RE não necessitam da indicação de terapia com tamoxifeno ou com inibidores de aromatase. Contudo, são mais sensíveis às combinações de quimioterápicos de primeira linha, envolvendo antraciclinas, como

por exemplo, a doxorrubicina e taxanos (GUARNERI et al., 2006). Sendo estes protocolos um esquema padrão de quimioterapia adjuvante e neoadjuvante para a maioria das pacientes, em virtude da maior eficácia clínica, reduzindo os riscos de recidiva (JACQUIM et al., 2012).

A doxorrubicina promove morte celular das células neoplásicas, porém não de forma seletiva, ocorrendo também, apoptose de cardiomiócitos, sendo conhecida assim, pela cardiotoxicidade cumulativa, aumentando consideravelmente o risco de evento cardíaco (KUMAR et al., 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2011). Além disto, a quimioterapia citotóxica tem como efeito adverso mais comum, a neutropenia. Entre as consequências clínicas da neutropenia encontram-se a ocorrência de neutropenia febril, causa comum de admissão hospitalar, e dificuldade em cumprir o calendário de tratamento quimioterápico levando a redução de doses ou atraso de administração de ciclos (BELASSO et al., 2010).

A heterogeneidade dos tumores mamários confere a esta neoplasia uma dificuldade de diagnóstico, tratamento e, também, um desafio na sobrevida e esquema terapêutico (CIRQUEIRA et al., 2011) Os tumores do subtipo luminal A são tumores pouco responsivos à quimioterapia, logo a hormonioterapia prevalece na escolha de tratamento para esta classificação de neoplasia mamária. Já o subtipo basal-*like*, tumor com elevada atividade mitótica, característica de necrose tumoral, comumente disseminam-se para órgãos como fígado, pulmão e metástase cerebral (GOLDHIRSCH et al., 2011) precisa ser avaliado quanto ao tipo adequado de tratamento, sendo geralmente tratado por uma quimioterapia isolada ou combinada, com base em antraciclinas por exemplo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2011).

2.2.4 Linhagens celulares de câncer de mama

As linhagens celulares de câncer de mama têm sido os modelos mais utilizados para investigar a desregulação da proliferação, apoptose e migração durante a progressão tumoral. A utilização destas linhagens resulta numa variedade de informações sobre os genes e as vias de sinalização que regulam estes processos. As linhagens celulares são de fácil propagação, relativamente simples à

manipulação genética e, em condições experimentais bem definidas, geralmente trazem resultados reprodutíveis e quantificáveis (VARGO-GOGOLA et al., 2007).

Há várias linhagens de câncer de mama disponíveis, em nosso estudo utilizamos duas linhagens: MDA-MB-231 e MCF-7; considerado o pior subtipo tumoral e o de melhor prognóstico, respectivamente.

A MDA-MB-231 é originada da efusão pleural de paciente caucasiana de 51 anos com adenocarcinoma de mama. São células que não expressam RE, RP e E-caderina, mas expressam vimentina e caderina-11, EGFR e fator de crescimento transformante alfa (TGF-alfa) (FELTES et al., 2002). Este tipo de linhagem é semelhante ao subtipo *basal-like*, considerado de pior prognóstico (SUBIK et al., 2010).

Já a linhagem MCF-7, oriunda de efusão pleural de paciente caucasiana de 69 anos com adenocarcinoma de mama, apresentam RE e RP, assim como E-caderina, mas não expressam vimentina e caderina-11. São células com baixo índice de invasão tecidual (LACROIX et al., 2004). Esta linhagem, dentre as classificações moleculares, enquadra-se no subtipo luminal A, tipo tumoral de bom prognóstico (SUBIK et al., 2010).

2.3 SISTEMA PURINÉRGICO

2.3.1 Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares e os receptores purinérgicos

Os nucleotídeos extracelulares de adenina ATP, ADP e AMP, e o nucleosídeo adenosina estão envolvidos em uma variedade de processos fisiopatológicos em diferentes células (ZIMMERMANN, 1999; ATKINSON et al., 2006). São importantes moléculas sinalizadoras que regulam diversas respostas em sistema como, por exemplo, o cardiovascular (BURNSTOCK; KENNEDY, 1986; ERLINGE et al., 2008), nervoso (ZIMMERMANN, 1993), na vasodilatação, no metabolismo ósseo, e na inflamação (HOEBERTZ et al., 2003; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

Os mecanismos celulares de liberação de nucleotídeos variam substancialmente, dependendo principalmente do tipo de célula. Uma vez liberados, estes nucleotídeos interagem com receptores purinérgicos específicos, mediando eventos de neurotransmissão, resposta imune e agregação plaquetária, entre outros

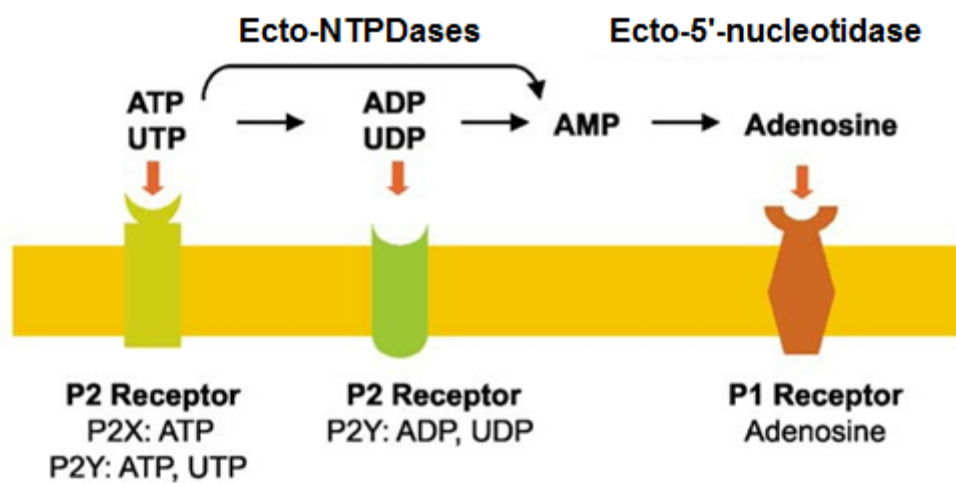
eventos (BURNSTOCK, 2007). A concentração destes nucleotídeos depende da quantidade liberada, do efeito da diluição no espaço extracelular e da atividade de enzimas de hidrólise, tais como as ectonucleotidases (GORDON, 1986; BURNSTOCK, 2007). Assim podemos dizer que a sinalização purinérgica envolve três principais componentes: 1) os nucleotídeos, 2) os receptores através dos quais eles exercem seus efeitos e 3) as ectoenzimas, responsáveis pelo controle dos níveis destas moléculas no meio extracelular (ATKINSON et al., 2006).

Após exercerem seus efeitos biológicos, as moléculas de nucleotídeos devem ser degradadas a fim de manter seus níveis em concentrações fisiológicas, o que é desempenhado pelas ectonucleotidases, enzimas que estão ancoradas à membrana com sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001). As ecto-NTPDases atuam convertendo o ATP em ADP e subsequentemente convertem o ADP em AMP. E, por fim, a enzima ecto-5'-nucleotidase converte o AMP formado em adenosina. A molécula de adenosina produzida desempenha vários papéis, dentre os quais se destacam os efeitos neuromodulatórios, a inibição da agregação plaquetária, a vasodilatação, a regulação de processos inflamatórios assim como, desempenha efeitos significativos em neoplasias. O desenvolvimento de um tumor, geralmente é acompanhado por escasso suprimento sanguíneo, reduzindo desta forma o suprimento de oxigênio e subsequente degradação de nucleotídeos, o que leva a formação de adenosina. Sabe-se que a elevação dos níveis de adenosina em tumores sólidos pode constituir um fator importante que facilita a neovascularização (SPYCHALA, 2000).

Cada célula responsável por liberar estes nucleotídeos possui receptores, os purinoreceptores, que são divididos em receptores do tipo P1 e P2 (ROBSON et al., 2006) (Figura 2). Os receptores do tipo P1, receptores de adenosina, são divididos em A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , sendo todos estes acoplados à proteína G. O outro grupo de receptores, o grupo P2, é subdividido em: P2X e P2Y (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1994; BURNSTOCK, 2007). Os receptores P2X são acoplados a canais iônicos ligados ao ATP, atuando via cátions mono e divalentes, sendo que seus domínios amino e carboxiterminal estão voltados para o lado citoplasmático, e até o momento já foram caracterizados sete membros, P2X₁ ao P2X₇. A transdução de sinal se dá pelo influxo de sódio e efluxo de potássio com despolarização da membrana, abrindo os canais de cálcio e aumento do cálcio intracelular. Os

receptores P2Y são sensíveis ao ATP e ADP, são receptores do tipo metabotrópicos, assim como os receptores P1, acoplados às proteínas G. Apresentam sete regiões transmembrana, com a porção aminoterminal voltada para o meio extracelular e a porção carboxiterminal voltada para o meio citoplasmático, e são subdivididos em: P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14} (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1994; DI VIRGILIO et al., 2001; ROBSON et al., 2006; BURNSTOCK, 2007).

Figura 2 – Receptores purinérgicos localizados na superfície celular e o catabolismo dos nucleotídeos no meio extracelular pelas ectonucleotidases

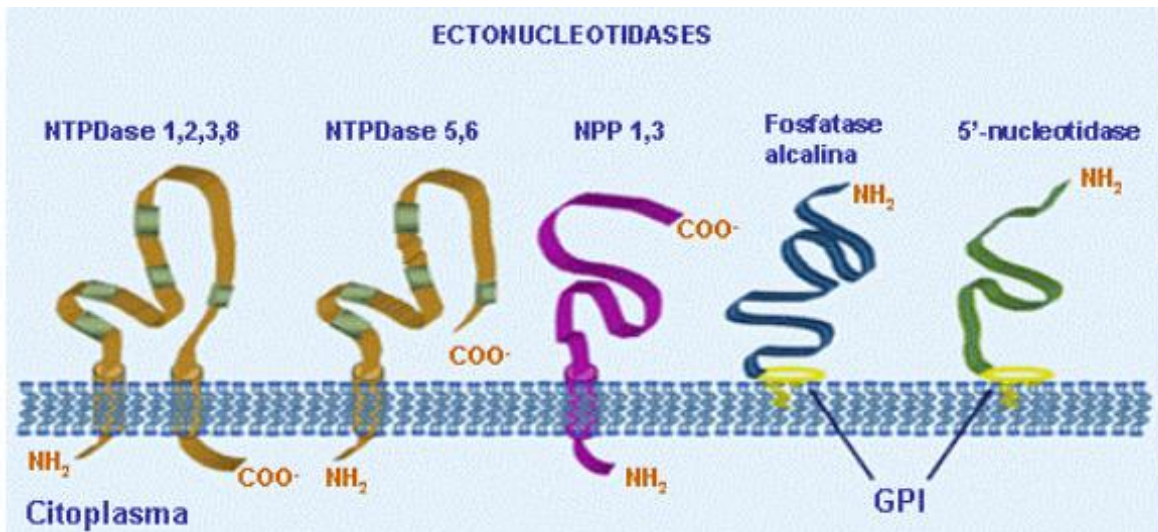


Fonte: Adaptado de Robson et al. (2006).

2.3.2 Ectonucleotidases

Os nucleotídeos de adenina são comprovadamente moléculas importantes no desempenho de inúmeras funções orgânicas, as quais dependem de suas concentrações no meio extracelular, bem como de suas ligações a receptores específicos. Porém, é de extrema importância que haja um controle dos níveis extracelulares destes nucleotídeos. Sabe-se que este controle é exercido por uma gama de enzimas ancoradas a membrana plasmática das células ou então localizadas no meio intersticial. São membros da classe das ectonucleotidases: as ecto-NTPDases (Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolase), a família das NPPs (Nucleotídeo Pirofosfatases/Fosfodiesterases), as fosfatases alcalinas e a ecto-5'-nucleotidase (Figura 3) (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006).

Figura 3 – Topografia de membrana das ectonucleotidasas



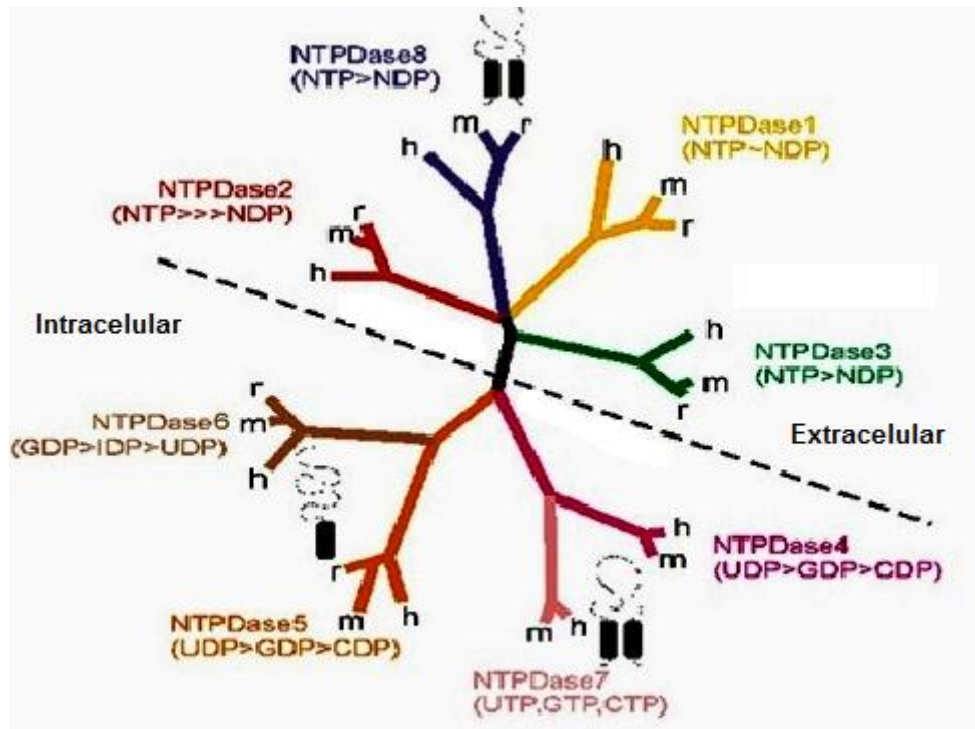
Fonte: adaptado de www.ccri.ca/sevigny.html Apud Cognato (2009).

2.3.2.1 Ecto-NTPDases

Há várias enzimas que hidrolisam ATP e ADP separadamente (BATTASTINI, 1991). A ecto-NTPDase é uma enzima capaz de degradar tanto o ATP quanto o ADP (ROBSON et al., 2006). Trata-se de um termo genérico para designar uma família de enzimas presentes na membrana plasmática de diversos tecidos.

As ecto-NTPDases catalisam a hidrólise de nucleotídeos difosfatados (NDP) e trifosfatados (NTP), com diferentes graus de preferência por um tipo individual. Entre as enzimas classificadas como ecto-NTPDases, quatro delas são enzimas localizadas na membrana celular com um sítio catalítico na face extracelular, são elas: ecto-NTPDase 1, 2, 3 e 8; e as outras quatro enzimas – ecto-NTPDase 4, 5, 6 e a 7 – exibem uma localização intracelular (ROBSON et al., 2006) (Figura 4).

Figura 4 – Membros da família das enzimas ecto-NTPDases



Fonte: Adaptado de Robson et al. (2006).

Todos os membros desta família apresentam em sua estrutura no mínimo cinco domínios chamados regiões conservadas de apirase (ACR), que é o local que apresenta grande similaridade na sequência de aminoácidos. Tais domínios estão diretamente envolvidos na atividade catalítica da enzima e/ou na integridade estrutural das ecto-NTPDases (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). Estas enzimas estão amplamente distribuídas nos tecidos animais e representam as principais ectonucleotidases expressas pelo endotélio e células musculares lisas do sistema circulatório (ZIMMERMANN et al., 1999; SCHETINGER et al., 2001).

A ecto-NTPDase-1 (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD39) foi a primeira enzima da família ecto-NTPDase a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001), esta enzima na superfície de plaquetas intactas de humanos pode estar envolvida na regulação da concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular.

As ecto-NTPDase1 e ecto-NTPDase2 estão presentes em uma grande variedade de tecidos, incluindo coração, placenta, pulmão, fígado, musculatura

esquelética, timo, rim, pâncreas, testículos, ovários, próstata, colón, cérebro (ZIMMERMANN, 1999) e plaquetas (PILLA et al., 1996). As ecto-NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão fortemente ligadas a membrana via dois domínios transmembrana, que no caso da ecto-NTPDase 1 são importantes para a manutenção da especificidade da atividade catalítica e do substrato. Os dois domínios também podem sofrer movimentos coordenados durante o processo de ligação e hidrólise dos nucleotídeos (GRINTHAL et al., 2006).

A ecto-NTPDase2 tem uma elevada preferência por nucleotídeo trifosfatado (ZIMMERMANN, 2001). A ecto-NTPDase3 (CD39L3, HB6) é um intermediário funcional que hidrolisa ATP/ADP em uma taxa molecular de aproximadamente 1:0,3 (SMITH et al., 1998). A enzima ecto-NTPDase4 possui uma função de UDPase, age hidrolisando UDP e outros nucleosídeos di e tri fosfatados, porém não é capaz de hidrolisar os nucleotídeos ATP e ADP (ZIMMERMANN, 2001).

Quando expressa em células COS-7, a ecto-NTPDase5 (CD39L4) é secretada e possui uma alta preferência por nucleosídeos 5'-difosfatados, especialmente UDP (MULERO et al., 1999). A ecto-NTPDase 6 hidrolisa preferencialmente nucleosídeos 5'- difosfatos. A análise imunohistoquímica sugere que a ecto-NTPDase 6 é associada ao complexo de golgi e a pequenas extensões da membrana plasmática (ZIMMERMANN, 2001).

A ecto-NTPDase7 (LALP1) foi clonada e caracterizada em humanos e ratos e possui localização intracelular, sendo classificada como uma endo-apirase, com preferência pelos substratos UTP, GTP e CTP (SHI et al., 2001). Já a ecto-NTPDase 8 foi caracterizada em ratos por Bigonnesse et al., 2004, e parece regular os níveis de nucleotídeos extracelulares de maneira distinta de outras ectonucleotidases.

A ecto-NTPDase1 (CD39), foco deste estudo, é superexpressa em várias linhagens de tumores humanos (rim, pulmão, ovário, tireóide entre outros) (BASTID et al., 2012) bem como em células T citotóxicas e células NK (Natural killer) (SCHULER et al., 2012; JIE et al., 2013).

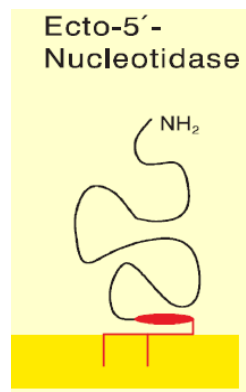
2.3.2.2 *Ecto-5'-nucleotidase*

A enzima ecto-5'-nucleotidase (CD73) é um glicoproteína ligada à membrana plasmática de diferentes células (Figura 5) (ZIMMERMANN, 2001), participa do

metabolismo de nucleotídeos de adenina, regulando a disponibilidade de adenosina através de receptores na superfície celular (LUDWIG et al., 1999). A adenosina é um importante metabólito liberado pelas células cancerosas, induzindo respostas fisiológicas e promovendo a progressão do tumor (SPYCHALA et al., 2004).

A atividade e expressão da ecto-5'-nucleotidase variam em células malignas. De acordo com Canbolat e colaboradores (1996), esta enzima apresenta atividade aumentada em câncer de mama. Spsychala e col. (2004) detectaram que a ausência de receptor de estrógeno em células tumorais de mama aumenta seletivamente a expressão de CD73 e a concentração de adenosina extracelular. Em contraste com a adenosina, o AMP, um precursor de adenosina, exerce um efeito inibitório no crescimento das células de câncer de mama. Logo o aumento da atividade da ecto-5'-nucleotidase, que converte AMP em adenosina, pode promover a progressão e proliferação do câncer de mama (CANBOLAT et al., 1996).

Figura 5 – Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana



Fonte: Adaptado de ZIMMERMANN, 2001.

2.3.3 Sistema purinérgico e os tumores

A atividade catalítica das enzimas ecto-NTPDase (CD39) e ecto-5'-nucleotidase (CD73) representa a principal fonte de adenosina, um importante fator de crescimento tumoral (SPYCHALA, 2000; SPYCHALA et al., 2004). A Ecto-NTPDase1 (CD39), hidrolisa ATP extracelular e ADP em monofosfato de adenosina (AMP). O AMP é então processado para a adenosina, essencialmente pelo CD73 ecto-5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 2001). Após a ligação da adenosina aos receptores A_{2A} de células T, induz o acúmulo de AMP cíclico intracelular, impedindo

deste modo a proliferação de linfócitos-T e secreção de citocinas inflamatórias. A adenosina também bloqueia a atividade citotóxica e produção de citocinas de células NK (HUANG et al., 1997).

A proliferação celular e a metástase são as principais características de um tumor maligno. A proliferação celular depende da síntese de uma grande quantidade de nucleotídeos (ZIMMERMANN, 2001). Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e o nucleosídeo correspondente, adenosina, representam uma importante classe de moléculas extracelulares que, ao interagirem com receptores específicos, sinalizam vias que são importantes para o funcionamento celular (BURNSTOCK, 2007).

Sabe-se, também, que os tumores malignos, desencadeiam uma forte resposta inflamatória e são frequentemente caracterizadas por formação de focos necróticos. Nestas condições, o ATP se acumula no espaço extracelular, como resultado de danos à membrana ou efluxo não específico através de vias específicas de permeação (SPYCHALA, 2000; GHIRINGHELLI et al., 2009). No entanto, novas descobertas mostram que a liberação de ATP, além de estar relacionada aos danos às células tumorais ou do estroma tumoral e como um subproduto da ativação de células inflamatórias, também se encontra intimamente envolvido no metabolismo celular do câncer e na resposta imune antitumoral (GHIRINGHELLI et al., 2009). A concentração de ATP extracelular e a sua taxa de degradação até a adenosina poderá ser algo benéfico ou prejudicial, o que depende, também, da expressão de receptores do tipo P2 nas células tumorais e células inflamatórias, receptores os quais são sensíveis a este nucleotídeo (BUXTON et al., 2010; DI VIRGILIO, 2012).

No microambiente tumoral pela condição de hipóxia há a geração do fator 1- α induzido por hipóxia (HIF-1 α), o qual leva a um aumento da atividade da ecto-5'-nucleotidase, aumentando assim os níveis de adenosina no meio extracelular (LUKASHEV et al., 2007). Este nucleosídeo no meio extracelular desempenha inúmeras atividades, como a vasodilatação e estímulo à angiogênese, assim como ação imunossupressora a qual inibe a resposta imunológica que controla o crescimento dos tumores (SPYCHALA, 2000). A resposta biológica desencadeada pelos nucleotídeos no meio extracelular depende da atividade enzimática das ectonucleotidases assim como, da expressão dos receptores purinérgicos P1 e P2 nas superfícies celulares.

O papel de regulação do crescimento tumoral mediado por receptores purinérgicos ainda é controverso, na linhagem celular de câncer de mama, MCF-7, o receptor P2 é ativado tanto por ATP quanto por UTP estimulando o crescimento, enquanto que, no carcinoma epitelial essa ativação resulta numa inibição do crescimento celular. Provavelmente, a explicação para estes diferentes efeitos do ATP sobre o crescimento celular esteja nos subtipos de receptores purinérgicos expressos em linhagens celulares (BUXTON et al., 2010).

Já foi demonstrado em células MCF-7 que a ativação dos receptores P2Y₂ por ATP induz a proliferação celular (DIXON et al., 1997). Os nucleotídeos extracelulares cooperam com o fator de crescimento para ativar a expressão do gene c-fos ligadas à resposta proliferativa de células MCF-7 através da ativação dos receptores P2Y₂ (WAGSTAFF et al., 2000).

A CD73 facilita a adesão, migração e invasão do carcinoma de mama, em linhagens celulares MDA-MB-231 e T-47D, através da geração de adenosina (WANG et al., 2008). Zhi e col (2007) relataram que o silenciamento gênico da CD73 em células MB-MDA-231 impediu a adesão destas células à matriz extracelular, assim como inibiu a migração celular. O ATP extracelular liberado pelas células tumorais e sua subsequente hidrólise até a adenosina, através da CD73, favorece a quimiotaxia de células tumorais (STAGG et al., 2010).

O papel de hipóxia na regulação da progressão do tumor é ainda controverso. No entanto, nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 (bem como a linhagem celular de câncer cervical HeLa), a expressão de receptores P2X₇ é aumentada na condição da hipóxia. Os autores mostraram ainda que este aumento de receptores P2X₇ impulsionado por hipóxia aumenta a invasão e a migração de células tumorais (TAFANI et al., 2011).

A estimulação dos receptores purinérgicos do tipo P1, especificamente o receptor A1, inibiu a proliferação de algumas células tumorais de câncer de mama como: MCF-7 e HS578T (GREIG et al., 2003). Já um efeito contrário foi verificado em um estudo com as células tumorais mamárias, MDA-MB-468, onde a depleção deste receptor atenuou tanto o crescimento quanto a proliferação tumoral (SCHÄFER et al., 2003).

Logo, devido à habilidade dos nucleotídeos extracelulares atuarem como fatores tróficos indutores do crescimento e da proliferação celular, envolvendo

atividade das ectonucleotidases bem como a sinalização de receptores purinérgicos, muitos estudos sinalizam que o sistema purinérgico por este estar envolvido na progressão tumoral (STAGG et al., 2010).

Os dados encontrados na literatura sugerem que a ativação da ecto-5'-nucleotidase, tanto quanto, de alguns receptores purinérgicos estão envolvidos no processo de carcinogênese de diversos tipos de neoplasias, como no câncer de mama. Assim, este estudo visa caracterizar melhor o envolvimento da sinalização purinérgica no efeito antitumoral do extrato hidro alcoólico da UT em células de câncer de mama. Extrato o qual foi escolhido pelos efeitos antiproliferativos de células tumorais já descritos na literatura (DE MARTINO et al., 2006; SHENG et al., 1998; 2002; 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos do extrato hidro alcoólico da *Uncaria tomentosa* em enzimas e receptores do sistema purinérgico de linhagens de câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em linhagens de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, tratadas com extrato hidro alcoólico de *Uncaria tomentosa*, isolada ou associada a tamoxifeno ou doxorrubicina,
- Avaliar a expressão da CD39 e CD73 em linhagens de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, tratadas com extrato hidro alcoólico de *Uncaria tomentosa*, isoladamente ou associada a tamoxifeno ou doxorrubicina,
- Verificar a expressão de receptores purinérgicos, P2X₇ e A₁, em linhagens de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, tratadas com extrato hidro alcoólico de *Uncaria tomentosa*, isolada ou associada a tamoxifeno ou doxorrubicina.

4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I

Uncaria tomentosa extract alters the catabolism of adenine nucleotides and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and P2X7 and A1 receptors in the MDA-MB-231 cell line

Karen Freitas Santos^{a,b*}, Jessié Martins Gutierrez^a, Micheli Mainardi Pillat^c, Vitor Braga Rissi^d, Maria do Carmo dos Santos Araújo^e, Gustavo Bertol^f, Paulo Bayard Dias Gonçalves^d, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Vera Maria Morsch^{a*}

Publicado no periódico: **Journal of Ethnopharmacology**.

Journal of Ethnopharmacology 194 (2016). 108-116.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.051>

Uncaria tomentosa extract alters the catabolism of adenine nucleotides and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and P2X7 and A1 receptors in the MDA-MB-231 cell line

Karen Freitas Santos^{a,b*}, Jessié Martins Gutierrez^a, Micheli Mainardi Pillat^c, Vitor Braga Rissi^d, Maria do Carmo dos Santos Araújo^e, Gustavo Bertol^f, Paulo Bayard Dias Gonçalves^d, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Vera Maria Morsch^{a*}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, CCNE, Federal University of Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, Prédio 18, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartment of Health Sciences, Regional Integrada University (URI), CEP 984000-000, Frederico Westphalen, RS, Brazil

^cChemistry Institute, University of São Paulo (USP), Avenida Professor Lineu Prestes 748, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

^dLaboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, Prédio 97, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^eSanta Maria University Hospital, Federal University of Santa Maria (HUSM), Avenida Roraima, Santa Maria, RS, Brazil

^fHerbarium Laboratório Botânico, LTDA, Curitiba, Brazil.

* Corresponding author:

Dra. Vera Maria Morsch

E-mail: veramorsch@gmail.com

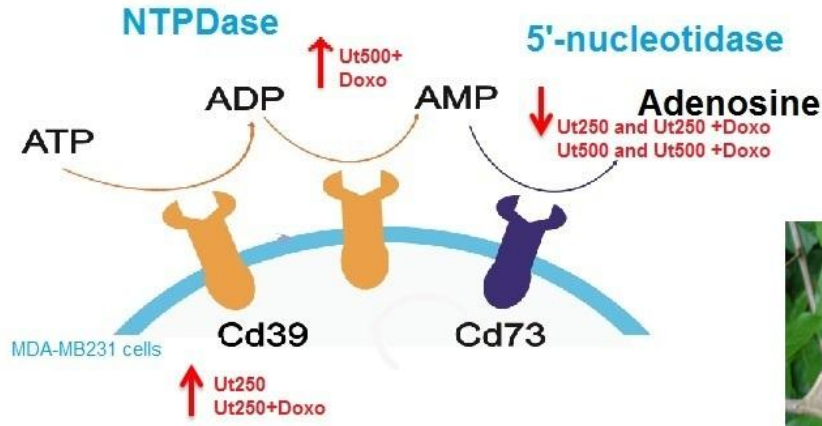
Tel: +55 -55-3220-9557

Karen Freitas Santos

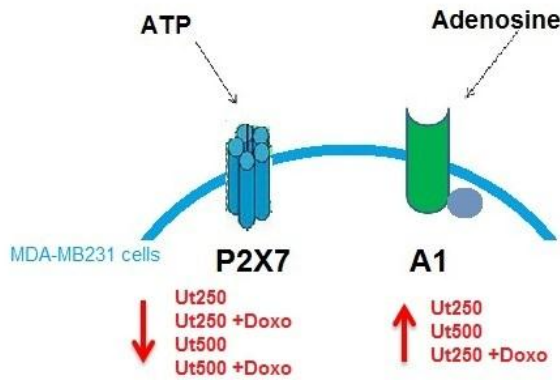
E-mail: karenf1003@gmail.com

Tel: +55- 55-9908-1434

Graphical Abstract



Uncaria tomentosa



Ut250: *Uncaria tomentosa* 250µg/mL

Ut500: *Uncaria tomentosa* 500µg/mL

Ut250 + Doxo: *Uncaria tomentosa* 250µg/mL and Doxorubicin 1µM

Ut500 + Doxo: *Uncaria tomentosa* 500µg/mL and Doxorubicin 1µM

Abstract

Ethopharmacological relevance: *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (Rubiaceae) (Ut), also known as cat's claw, is a woody liana widely spread throughout the Amazon rainforest of Central and South America, containing many chemical constituents such as oxindole alkaloids, which are responsible for various biological activities. Since ancient times, the indigenous people of Peru have used it as a bark infusion for the treatment of a wide range of health problems gastric ulcers, arthritis and rheumatism. Recently, Ut is distributed worldwide and used as an immunomodulatory and anti-inflammatory herbal remedy. Additionally, *U. tomentosa* also has antitumoral activity. However, little is known about the action of *U. tomentosa* on the purinergic system mechanisms, which is involved in tumor progression.

Aim of the study: Considering the pharmacological properties of *U. tomentosa*, we sought to evaluate the hydroalcoholic extract *U. tomentosa* is able to influence the purinergic system in breast cancer cells, MDA-MB-231. Through the activity and expression of ectonucleotidases (NTPDase – CD39; Ecto-5'-nucleotidase – CD73) and purinergic receptors (P2X7 and A1).

Materials and methods: A hydroalcoholic extract was prepared in two concentrations, 250 and 500 µg/mL. (Ut250; Ut500). The effect of these concentrations on the activity and expression of ectonucleotidases, as well as on the density of purinergic receptors were investigated in MDA-MB-231 breast cancer cells. Cells were treated with the hydroalcoholic extract of *Uncaria tomentosa* and/or doxorubicin (Doxo 1 µM; Ut250+ Doxo; Ut500+ Doxo) for 24 h.

Results: Although the results were not significant for the hydrolysis of the ATP, they presented an increase in the ADP hydrolysis in the Ut500+ Doxo group when compared to the control group. Additionally, the activity of 5'-nucleotidase was inhibited in all groups when compared with the untreated group of cells. Inhibition of the enzyme was more evident in groups with *U. tomentosa* per se. The expression of CD39 was increased in the Ut250 and Ut250+ Doxo groups when compared to the control group. No changes were found in the CD73 expression. Furthermore, a reduction in the density of the P2X7 receptor in all treated groups was detected. On

the other hand, the density of the A1 receptor increased in all groups compared to the control group, with the exception of the Ut500 + Doxo group.

Conclusion: Therefore, we conclude that hydroalcoholic extract of *U. tomentosa* may be responsible for the reduction of adenosine levels in the extracellular medium, which accelerates tumor progression. Interestingly, the dysregulation of A1 and P2X7 receptors in the MDA-MB-231 cells exacerbate the proliferation of this cells and *U. tomentosa* treatment may be stimulate the antitumor activity of adenosine A1 receptor and control the P2X7 effects. Our study demonstrates the significant participation of purinergic pathway in the regulation of MDA-MB-231 progression; additionally, *U. tomentosa* treatment alone or combined with chemotherapy may favor the action of doxorubicin.

Keywords: *Uncaria tomentosa*, Cancer, NTPDase, Ecto 5'-nucleotidase, Purinergic receptors

1. Introduction

Uncaria tomentosa (Willd.) DC. (Rubiaceae), also known as cat's claw, is a woody liana widely spread throughout the Amazon rainforest of Central and South America (Rizzi et al., 1993). Since ancient times, the indigenous people of Peru used it as a bark infusion for the treatment of a wide range of health problems such as cancer, gastric ulcers, arthritis and other inflammatory process (Keplinger et al., 1999; Heitzman et al., 2005). A wide spectrum of biological activities of this plant results from the presence of many secondary metabolites, and several phytochemical studies have shown that more than 50 chemical constituents exist in cat's claw, including tetracyclic and pentacyclic oxindole alkaloids (Keplinger et al., 1999; Heitzman et al., 2005). *U. tomentosa* is a medicinal herb that possesses important antioxidant properties (Pilarski et al., 2006) used for various therapeutic purposes including arthritis, rheumatism, inflammatory diseases, and cancer (Laus et al., 1997).

Currently, natural products play a relevant role in cancer therapy, in which a substantial number of anticancer agents used in clinical treatments originate from various natural sources such as plants, animals and microorganisms (Nobili et al.,

2009). Various alkaloids, many secondary metabolites isolated from plants are also well known anticancer alkaloids, which act selectively on cancer cells affecting cell cycle progression (Urra et al., 2013). *U. tomentosa* presents additional activities, including immune stimulation (Sheng et al., 2005), induction of apoptosis in different cell lines (Sheng et al., 2000; De Martino et al., 2006), as well as antioxidant activity (Pilarski et al., 2006 and 2010) and antitumoral activity in the Walker-256 cancer model (Dreifuss et al., 2010).

Breast cancer is the most common cancer in women. It is routinely classified by stage, pathology, grade and expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) or human epidermal growth factor receptor (Her2/neu) (Fernandez et al., 2010; Beamont and Leadbeater, 2011). The absence of expression in all these receptors is known as triple-negative breast cancer (TNBC) (Foulkes et al., 2010; Elias, 2010). Notably, approximately 15-20% of globally diagnosed breast cancer is characterized as TNBC (Foulkes et al., 2010). The MDA-MB-231 cell, which is an invasive ductal carcinoma line, is an example of TNBC (Cailleau et al., 1978; Engel and Young, 1978, Tokunaga, 2006).

Some authors have proven that there is a positive relationship between the presence of hormone receptors and a more favorable prognosis for breast cancer (Osborne, 1990; Blows et al., 2010). Thus, patients with negative tumors for both receptors (ER, PR and HER2) presented worse prognosis than those negative for only one receptor (Reiner et al., 1990; Cianfrocca and Goldstein, 2004; Blows et al., 2010).

One of the treatment options for breast cancer may be chemotherapy, which can be a single or combined therapy utilizing multiple drugs (Ozer et al., 2000). Anti-carcinogenic drugs may act through different mechanisms preventing cell proliferative capacity (Nobili et al., 2009; Rosales-Hernandez et al., 2009). However, conventional chemotherapy causes severe side effects, with limited success rates due to insufficient drug concentrations, high systemic toxicity, lack of selectivity, and increased tumor resistance to drug therapy after prolonged treatment (Xu and Mcleod, 2001).

Solid tumors, such as those seen in breast cancer, often cause chronic hypoxia and necrosis that lead to the release of adenine nucleotides. Hypoxic tumors release purines into their immediate environment (Spychala, 2000); in this context, the

metabolism of such purines is proposed to be associated with tumor progression in breast cancer (Spychala et al., 2004).

Extracellular purines and pyrimidines are signaling molecules that have many different effects on biological processes (Burnstock and Knight, 2004). The hydrolysis of ATP to AMP is catalyzed either-by ecto-ATPDases or NTPDase (Zimmermann, 2001) and the AMP formed by this enzyme is hydrolyzed to adenosine by the action of an ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 1992).

Ecto-5'-nucleotidase/CD73 is expressed in many different tissues and this enzyme has been described as an important molecule in cancer progression, involved in the control of cell growth, maturation, and differentiation, as well as in drug resistance and tumor-promotion (Spychala, 2000; Wang et al., 2008).

The extracellular ATP is capable of activating ionotropic receptors such as P2X7, and the activation of this receptor can lead to inhibition or proliferation of cancerous cells according to the type of tumor. (Roger et al., 2014). Additionally, the metabotropic receptor A1, which is adenosine sensitive, possesses pro-tumor or anti-tumor activity, depending on the type of cancer cell (Gessi et al., 2011).

Considering the pharmacological properties of *U.tomentosa* is still necessary to trace their possible mechanisms of action or properly which will be their target molecular pathway. Our primary aim in this study is try to supply evidence if the hydroalcoholic extract of *U. tomentosa* may be regulate the alterations in purinergic system in the MDA-MB-231 breast cancer cells.

2. Materials and Methods

2.1 *Uncaria tomentosa* extract

Uncaria tomentosa extract (5%) was prepared by ultra-turrax extraction (Biotron-Kinematica AG) of ground bark of plants from Peru (Naturex) with 70% ethanol (Dipalcool). The fluid was centrifuged (Centrifuge Suzuki), concentrated in a heating tank (MCA-ALW) to remove the alcohol, and spray-dried (Kohls) using silicon dioxide (Evonik) and microcrystalline cellulose 102 (Blanver) as excipients. The *Uncaria*

tomentosa extract was gently donated by Herbarium Botanic Laboratory, Curitiba, Brazil.

2.2 Analysis of dry *Uncaria tomentosa* extract

The following reagents were used: acetonitrile (JTBaker), triethylamine (Fluka), acetic acid (JTBaker), polyamide (Fluka), ethanol (Vetec), and ultrapure water. Sample extraction was performed using a Unique ultrasound, model USC 5000A, at 40 kHz. Chromatographic analyses were performed on the Agilent 1100 HPLC system and a Zorbax XDB C-18 column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm Agilent) at 15°C. Samples (80 mg) were diluted in 60% ethanol (10 mL) and subjected to sonication (20 min at 30°C). Next, 2 mL of sample was passed through a column containing 200 mg of polyamide, and the eluate was injected into an HPLC system. Separation was achieved using gradient elution of water (0.2% acetic acid) adjusted to pH 6.9 with triethylamine (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.8 mL/min, detection was performed at 245 nm, and the concentration of oxindole alkaloids (OA) was calculated as previously described in Bertol and coworkers (Bertol et al., 2012).

2.3 Cell lines and cell culture

MDA-MB-231 cells were obtained from Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ (Code BCRJ: 0164). Cells were cultured and frozen in liquid nitrogen for storage. Subsequently they were grown in culture in Eagle's medium, modified according to Dulbecco: Nutrient Mixture (DMEM-F12) (Sigma Chemical Co., Italy) supplemented with 100UI/mL of penicillin, 100μg/mL of streptomycin, 0,25μg/mL of amphotericin and 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab). The cells were cultured in bottles and stored at 5% CO₂ at the temperature of 37°C until the formation of cell monolayer, after, the cell bottles were subjected to trypsinization.

2.4 Cell treatments

Cells were seeded in 24-multiwell plates at densities of 1×10^4 cells/well in a final volume of 1mL of culture medium. And in cell culture flasks, surface area 25cm², at

densities of 1×10^6 cells/well in a final volume of 5mL of culture medium, for flow cytometry. Either was allowed to adhere overnight at 37°C. The cells were treated with *Uncaria tomentosa* (250 e 500µg/mL) and doxorubicin (1µM) (Eurofarma, SP), a commonly used anthracycline chemotherapy. for 24h as described below:

- i - Control group: cells with culture medium only
- ii - Ut250 group: Cells with *Uncaria tomentosa* extract at 250µg/mL
- iii - Ut500 group: Cells with *Uncaria tomentosa* extract at 500µg/mL
- iv - Doxo group: Cells with doxorubicin at 1µM
- v - Ut250 + Doxo: Cells with *Uncaria tomentosa* extract at 250µg/mL and doxorubicin at 1µM
- vi - Ut500 + Doxo: Cells with *Uncaria tomentosa* extract at 500µg/mL and doxorubicin at 1µM

2.5 Cell counting

The cells harvested by incubation for 5 min with 0,05% (w/v) trypsin (Sigma) in Hanks buffered solution (Gibco/Invitrogen) containing 0.3 mmol/L EDTA followed by the addition of 10% FBS (Cultilab) to inactivate the trypsin. Cells were quantified using a Neubauer chamber, and cellular viability was assessed using the trypan blue exclusion method.

2.6 Cell viability by MTT assay

Cell viability was evaluated using the MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (Sigma) reduction assay. In brief, MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/well in 200µL culture medium, in 96-well plates and incubated overnight at 5% CO₂ at the temperature of 37°C to adhere. After, cells were treated as described in the previous section and incubated for 24 hours. The cells were washed with culture medium and MTT (0.5 mg/mL) was added to each well. The cells were grown for a further period of 2.5 h and then carefully washed with PBS. DMSO (200 µL) was added to each well and absorbance was read at 595 nm.

2.7 Enzymatic assay

The MDA-MB-231 cells were washed 3 times with phosphate-free incubation medium in the absence of substrate. The reaction was started by the addition of 200 μ L of the incubation medium containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM CaCl_2 for ecto-NTPDase assay and 2 mM MgCl_2 for determining ecto-5'-nucleotidase. The reaction was started by adding ATP, ADP or AMP to the reaction medium to a final concentration of 2.0 mM and the incubation proceeded for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by removing an aliquot of the incubation medium and transferring to a tube containing TCA 10% previously placed on ice. The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by malachite green method (Chan et al., 1986), using KH_2PO_4 as a Pi standard. Controls to correct non-enzymatic hydrolysis of nucleotides were performed by measuring the Pi released into the same reaction medium incubated without cells. All assays were performed in triplicate. Activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein (nmol Pi/min/mg).

2.8 Protein determination

Cells in the 24 multiwell plates were dried and solubilized with 100 μ L of NaOH 1N and frozen overnight. An aliquot was then removed and the protein was measured by the Coomassie blue method, using bovine serum albumin as standard.

2.9 Flow cytometry

For flow cytometry analysis, MDA-MB-231 cell line was maintained in culture flasks until reach confluence. Cells were then trypsinized, dissociated and counted immediately in a hemocytometer. Then 1×10^6 cells were centrifuged for 5 min at 400 x g and washed twice with phosphate buffered saline (PBS) plus 3% fetal bovine serum (SFB). The sediments were suspended and incubated for 30 minutes with purified mouse anti-human CD39 and anti-human CD73 antibody (BD Pharmingen TM) (1:10). The same number of cells was incubated without antibodies. All samples

were washed with PBS and immediately analyzed by flow cytometry (BD ACCURI C6) and FlowJo software.

2.10 Western blot analysis

The determination of the density of P2X7 and A1 receptors were carried out by Western blot analysis, as previously described (Duarte et al., 2009). Briefly, each sample was diluted with five volumes of SDS-PAGE buffer containing 30% (v/v) glycerol, 0.6 M dithiothreitol, 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate and 375 mM Tris-HCl pH6.8, and boiled at 95 °C for 5 min. These diluted samples were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (7.5% separation gel with a 4% concentrate in gel in the top) under reducing conditions, in two or three different protein concentrations, together with pre-stained molecular weight markers (Biorad, USA), and then electro transferred to polyvinylidene difluoride membranes (0.45 µm, from Amersham Biosciences, UK). After blocking for 1 h at room temperature with 5% milk in Tris-buffered saline (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, pH7.6), containing 0.1% Tween 20 (TBS-T), the membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies against P2X7R (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Brazil) and A1R (1:800, Santa Cruz Biotechnology, Brazil). The selectivity of the tested antibodies against P2X7 and A1 receptors has previously been validated. After three 15 min washing periods with TBS-T containing 0.5% milk, the membranes were incubated with the alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG or anti-goat IgG secondary antibody (dilution 1:10,000) in TBS-T containing 1% milk during 90 min at room temperature. After three 20 min was TBS-T with 0.5% milk the membranes were incubated with enhanced chemo-fluorescent substrate (Amersham Biosciences) and then analyzed with a Amersham Imager 600 (GE Healthcare life Sciences). The membranes were then reprobated and tested for β-actin immunoreactivity to confirm that similar amounts of protein were applied to the gels. Briefly, the membranes were incubated at room temperature for 30 min with 40% (v/v) methanol and 1 h with 0.1 M glycine buffer pH 2.3, and then blocked as previously described before incubation with an anti-β-actin antibody (dilution 1:10,000) for 2 h at room temperature. The membranes were then washed, incubated with an anti-mouse IgG alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody and analyzed as described above.

2.11 Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc test. Differences between mean values were considered significant at $p < 0.05$, $p < 0.001$.

3 Results

3.1 Analysis of extract and Cell viability

Figure 1A shows the HPLC analysis of dry *Uncaria tomentosa* extract has a content of 4.20% oxindole alkaloids (OA) quantified as the sum of speciophylline, uncarine F, mitraphylline, rhynchophylline, isomitraphylline, uncarine C, isorhynchophylline, and uncarine E.

Cell viability was assessed by MTT assay, which indicates the degree of cell damage by quantifying mitochondrial dehydrogenase activity. No significant difference was observed in cell viability while cells were incubated for 24h with Ut at concentrations of 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$ alone (Ut 250 and Ut 500 groups, respectively) or in combination with 1 μM Doxo (Ut250 + Doxo and Ut500 + Doxo groups, respectively), compared with Doxo group. The groups treated with different concentrations of Ut, alone or in combination with Doxo, showed a significant decrease in cell viability ($p < 0.05$) when compared with the control (Figure 1B).

A viable cell count was also performed using trypan blue (data not shown), where the control group showed a viability of 93% and the *U. tomentosa* groups and/or doxorubicin treatment obtained 78-84% cell viability, respectively.

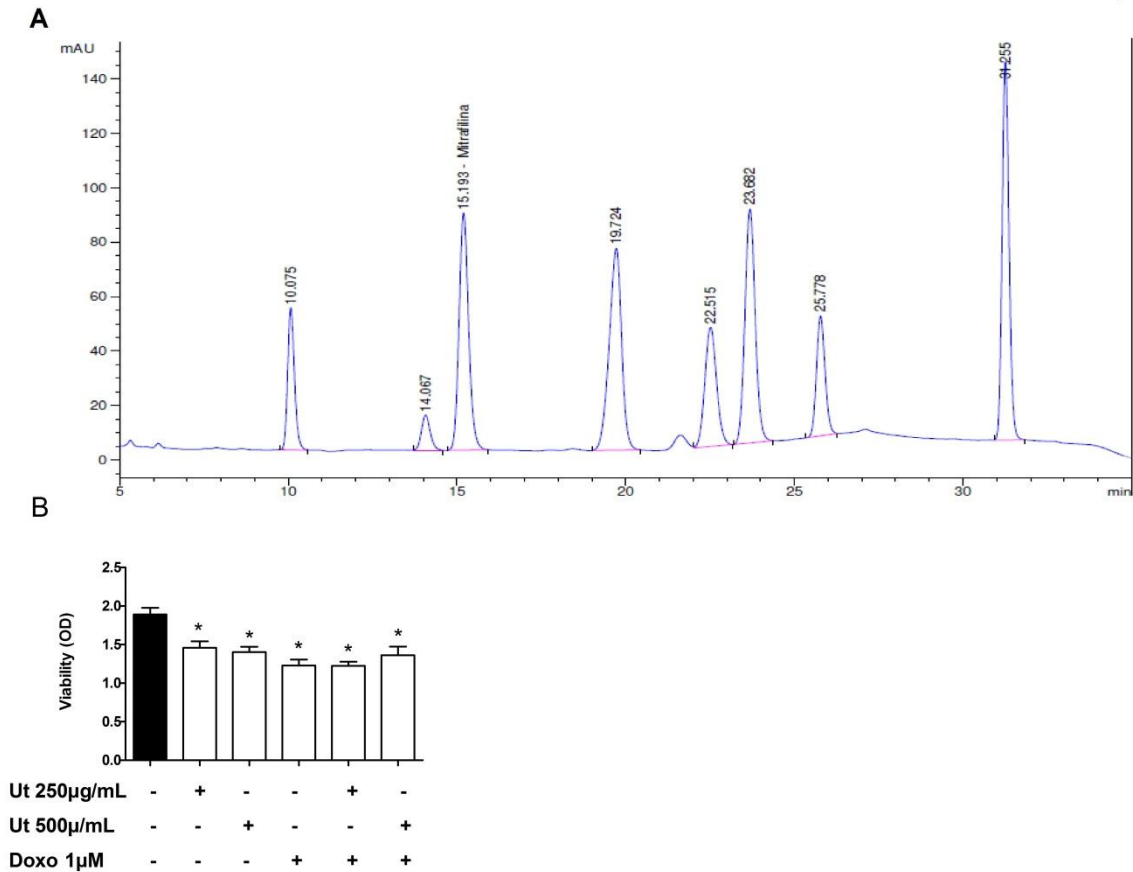


Figure 1 – HPLC-Fingerprint analysis of dry extract from *Uncaria tomentosa* and cellular viability. (A) 1- Speciophylline (10.075 min), 2- Uncarine F (14.067 min), 3- Mitraraphylline (15.193 min), 4- Rhynchophylline (19.724 min), 5- Isomitraraphylline (22.515 min), 6- Uncarine C (23.682 min), 7- Isorhynchophylline (25.778 min), and 8- Uncarine E (31.255 min); (B) Viability of the MDA-MB-231 cells. Cell cultures were treated with different concentrations of the hydroalcoholic extract *Uncaria tomentosa* (Ut250 and Ut500) and/or Doxorubicin 1 μ M (Doxo) for 24 h. Experiments were performed in triplicate. Results are presented as mean \pm SD. (*) Indicates a significant difference at $P < 0.05$ between untreated cells and treated cells.

3.2 NTPdase and 5'-nucleotidase activities:

Figure 2A shows the ATP hydrolysis in MDA-MB-231 breast cancer cell line. The statistical analysis has not shown significant difference in the ATP hydrolyses in the Ut250 and Ut500 groups compared with the control and Doxo group. *U. tomentosa*

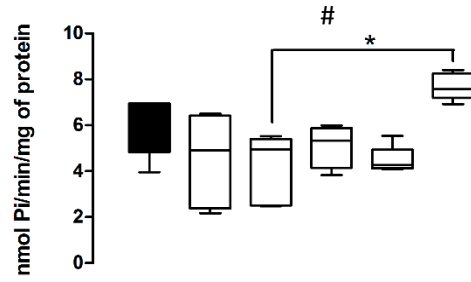
extract 500 µg/mL associated with doxorubicin 1µM (Ut500 + Doxo group) showed an increase in ATP hydrolysis when compared to the Ut500 group.

In the Figure 2B, the Ut500 + Doxo group showed an increase in ADP hydrolysis, therefore the combination of Ut500 with doxorubicin showed an increase in the NTPDase activity in MDA-MB-231 breast cancer cells. However, when we observed the ADP hydrolysis by the other groups was not found significant differences.

Figure 2C represent the 5'-nucleotidase activity in the MDA-MB-231 breast cancer cells. The 5'-nucleotidase inhibition was found in all groups compared to the control group. The Ut250 (0.632 ± 0.210 nmol Pi/min/mg) and Ut500 groups (0.328 ± 0.442 nmol Pi/min/mg) significantly reduced enzyme activity compared to the control group (1.592 ± 0.318 nmol Pi/min/mg).

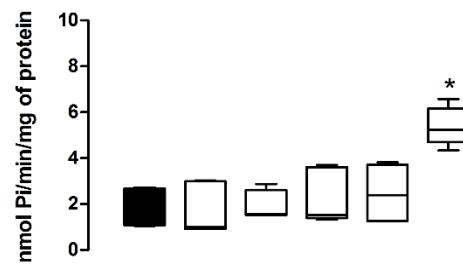
On the other hand, when *U. tomentosa* (Ut250 and Ut500) was associated with doxorubicin, which is the most widely used chemotherapy in breast cancer treatment, was observed a reduction in AMP hydrolysis in the Ut250+Doxo (0.279 ± 0.120 nmol Pi/min/mg) and Ut500 + Doxo (0.330 ± 0.095 nmol Pi/min/mg) (Figure 2C).

A ATP hydrolysis



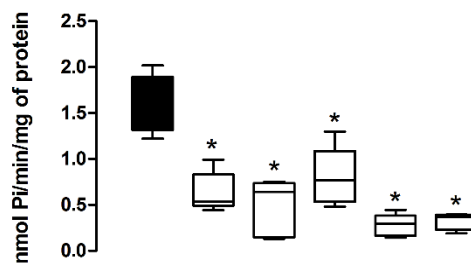
Ut 250 $\mu\text{g/mL}$	-	+	-	-	+	-
Ut 500 $\mu\text{g/mL}$	-	-	+	-	-	+
Doxo 1 μM	-	-	-	+	+	+

B ADP hydrolysis



Ut 250 $\mu\text{g/mL}$	-	+	-	-	+	-
Ut 500 $\mu\text{g/mL}$	-	-	+	-	-	+
Doxo 1 μM	-	-	-	+	+	+

C AMP hydrolysis



Ut 250 $\mu\text{g/mL}$	-	+	-	-	+	-
Ut 500 $\mu\text{g/mL}$	-	-	+	-	-	+
Doxo 1 μM	-	-	-	+	+	+

Figure 2 - NTPDase activity in the MDA-MB-231 cells using ATP (A), ADP (B) as substrate and 5'-nucleotidase activity in the MDA-MB-231 cells using AMP (C) as substrate at a final concentration of 2 mM. Cell cultures were treated with different concentrations of the hydroalcoholic extract *Uncaria tomentosa* (Ut250 and Ut500) and/or Doxorubicin 1 μ M (Doxo) for 24 h. Experiments were performed in triplicate. Results are presented as mean \pm SD. (*) Indicates a significant difference at $P < 0.05$ between untreated cells and treated cells. (#) Indicates a significant difference at $P < 0.05$ between treated groups of cells.

3.3 Ectonucleotidases expression by flow citometry

In the Figure 3A, NTPDase1/CD39 expression was increased in the Ut250 and Ut250+Doxo groups, which shows the percentage of CD39-positive cells, which depicts histograms showing the CD39 expression (Figure 3C and 3E).

A significant reduction was observed in the CD73 expression on the Ut500 group when compared with the Doxo group (Figure 3B) (93.35 ± 4.031 frequency Doxo group). However, there no differences were founded in the expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the MDA-MB-231 cells treated with *U. tomentosa* and/or doxorubicin, although the Ut500 ($59.30\% \pm 1.414$) and Ut500+Doxo ($66.05\% \pm 2,192$) groups revealing a tendency to decrease the expression of CD73 in relation to control group ($90.95\% \pm 6,293$)(Figure 3B), which shows the percentage of CD73-positive cells, which depicts histograms showing the CD73 expression (Figure 3D and 3F).

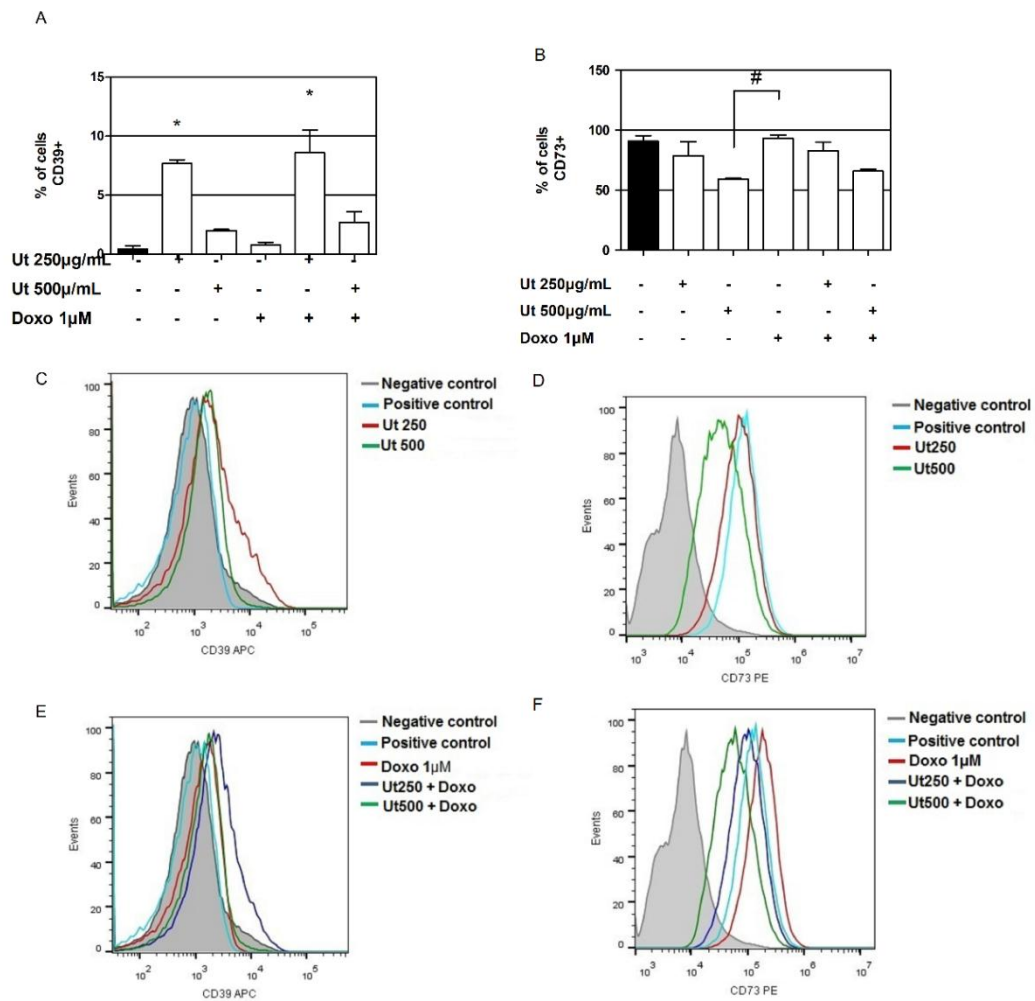


Figure 3 – Expression of C39 and CD73 in MDA-MB-231 cells. Cell cultures were treated with different concentrations of hydroalcoholic extract *Uncaria tomentosa* and/or Doxorubicin 1µM (Doxo) for 24 h. (A) Percentage frequency (%) of the CD39 cells positive (NTPDase), (B) and CD73 cells positive (ecto-5'-nucleotidase), (C) and (E) expression of CD39 (NTPDase), (D) and (F) Expression of CD73 (ecto-5'nucleotidase). Experiments were performed in duplicate. Results are presented as mean \pm SD. (*) Indicates a significant difference at $P < 0.05$. (#) Indicates a significant difference at $P < 0.05$ between treated groups of cells.

3.4 P2X7 and A1 receptors by Western blot analysis

Figure 4 shows the purinergic receptor expression, as adenosine A1 and P2X7 receptors. There was a significant increase in the adenosine A1 receptor expression

in Ut250, Ut500, Doxo and Ut250+Doxo groups, compared with the control. The immunoreactivity was $305.9 \pm 5.0\%$ for the Doxo group, while it was $218.2 \pm 10\%$, 331.9 ± 25.17 , $253 \pm 45.09\%$ for Ut250, Ut500, and Ut250+Doxo groups, respectively (Figure 4A).

Ut500+Doxo group presented no difference when compared to the control group. When this group was compared with the Ut500 and Doxo groups, a significant reduction in the expression of the A1 receptor was observed. Similarly, the Ut250 group showed a decrease in the expression of this receptor compared to the Doxo.

For the P2X7 receptor, all treatment groups exhibited a significant reduction in the expression of this receptor when compared with the control group (Figure 4B). Besides the all the groups treated, the Ut500+Doxo group showed a pronounced reduction in the P2X7 expression. Furthermore, we observed that Ut500+Doxo group had a significant reduction in the P2X7 receptor expression compared to the Ut500 and Doxo groups (Figure 4B).

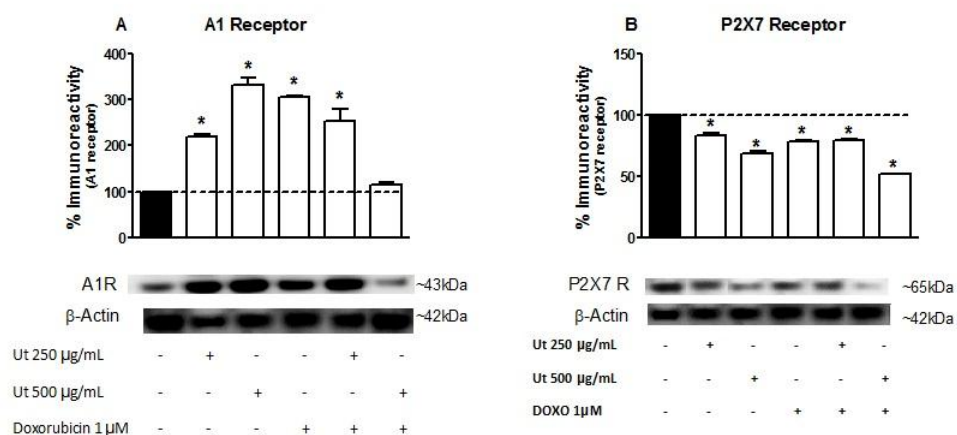


Figure 4 – Expression profiles of the A1 receptor (A) and P2X7 (B) receptor in the MDA-MB-231 breast cancer cells detected by western blotting (WB). Cell cultures were treated with different concentrations of the hydroalcoholic extract *Uncaria tomentosa* (Ut250 and Ut500) and/or Doxorubicin $1\mu\text{M}$ (Doxo) for 24 h. Experiments were performed in triplicate. β -actin was used as an internal control. (*) Indicates a significant difference at $P < 0.05$.

4 Discussion

In nature, Cat's claw occurs in two different chemotypes characterized by pentacyclic (POA) or tetracyclic (TOA) patterns of indole and oxindole alkaloids (Keplinger et al., 1998). Most of the pharmacological activity has been attributed to the one containing more pentacyclic (rather than tetracyclic) oxindole alkaloids (Philp, 2004). The *U. tomentosa* extract used in our study had an oxindole alkaloids concentration of 4.20%. Currently, there is a considerable amount of attention towards studies of anticancer properties of *Uncaria tomentosa*.

A study fulfilled by Oliveira et al. (2014) showed an increase in apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells (HT29) treated with *Uncaria tomentosa* 750µg/mL and oxaliplatin. As previously reported, there was antiproliferative activity in the promyelocytic leukemia cells (HL-60) (Sheng et al, 1998;. Pilarski et al, 2007) as well as in the breast cancer cells, MCF-7 (Riva et al., 2001).

Recently, our research group conducted studies with *Uncaria tomentosa* and concluded that this plant stimulates proliferation of myeloid precursor cells (Farias et al., 2011). The other study was a randomized clinical trial with patients diagnosed with breast cancer. In this study the patients received tablets of Ut (250-350mg) between the chemotherapy cycles. The use of *U. tomentosa* in patients with breast cancer reduced neutropenia, one of the side effects of chemotherapy (Araújo et al., 2012).

Based on the promising results found in the in vivo study carried out by our research group and the results *in vitro* performed by other researchers with *Uncaria tomentosa*, in a triple-negative breast cancer cell line (MDA-MB-231), which it represents a sub-type of breast cancer with worse prognosis (Marméa et al., 2015). However, it is important to note that cancer is a vast group of diseases that may vary substantially amongst themselves and present different outcomes among tumor lineages (Pilarski et al., 2010).

Adenosine, which is generated from AMP, has been shown as an important metabolite released by cancer cells that elicits physiological responses and promotes tumor progression (Spychala et al., 2004). Furthermore, adenosine has immunosuppressive effects, which can increase the migration of tumor cells *in vitro* and metastasis *in vivo* through the activation of the adenosine A2B receptor (Stagg

et al., 2010a). AMP is generated by the stepwise catabolism of ATP into AMP via the intermediate ADP and is subsequently converted to adenosine. The conversion of ATP into AMP is predominantly catalyzed by NTPDase1/CD39 with only trace amounts of ADP being released whereas ecto-5'-nucleotidase/CD73 catalysis the conversion. The NTPDase 1/CD39 is an enzyme responsible for the hydrolysis of ATP to ADP and ADP to AMP (Zimmermann, 2001). Our results showed that the *U. tomentosa* extract does not influence the activity of NTPDase, and in the same way doxorubicin, an anthracycline antibiotic that is widely used for solid tumors such as breast cancer (Gewirtz, 1999), also does not alter the enzymatic activity of NTPDase.

ATP is a multifunctional molecule that acts as the primary source of energy in living cells, as well as a signaling molecule that regulates diverse extracellular processes, including ion transport, apoptosis, secretion and tumor growth (White and Burnstock, 2006). Depending on the dose and the purinergic P2 receptor subtype engaged, ATP can trigger many different cellular responses, ranging from cell death to proliferation (Jin et al., 2014). The balance between adenosine and ATP is crucial in immune homeostasis because ATP is a danger signal released by damaged and dying cells that acts to prime immune responses through the ligation of P2X and P2Y purinoreceptors. ATP, via the activation of the P2X7 of dendritic cells (DCs) and the secretion of interleukin (IL)-1 β and IL-18 where these chemical mediators can stimulate T cells CD8⁺ that when activated to produce IFN- α triggering anti-tumor immune response. By contrast, adenosine suppresses immune responses through the activation of G-protein-coupled receptors (Stagg and Smyth, 2010b).

An increase in ATP hydrolysis in the Ut500 + Doxo group was observed when compared with the Ut500 group, thereby reducing the concentration of this nucleotide in the target area and generating more ADP (Figure 2A). In this same group, an increase in the ADP hydrolysis was observed in comparison with the control group (Figure 2B), generating more AMP. In contrast to adenosine, AMP, which is a precursor of adenosine, has an inhibitory effect on breast cancer cell growth (Mazurek et al., 1997). Furthermore, it was possible to observe an increase of NTPDase activity in the Ut500+Doxo group, and although there is no significant difference, this same group presented a tendency for increased expression of CD39 in relation to the untreated cells group (Figure 3A and 3E). Consequently, we can

infer that an increase in activity and expression of CD39 may be release AMP amounts in the medium, which is essential to inhibit tumor progression.

All treatments reduced the activity of the ecto-5'-nucleotidase enzyme when compared with the untreated MDA-MB-231 breast cancer cells. This reduction represents an increase in AMP levels in the cell line MDA-MB-231. The reduction in ecto-5'-nucleotidase activity was more prevalent in the groups in which the treatment was associated with Ut at both concentrations with doxorubicin (Figure 2C).

According to Canbolat et al. (1996), the increased activity of ecto-5'-nucleotidase, which converts AMP to adenosine, appears to promote the growth of breast cancer cells. In our study, there was a reduction in the activity of 5'-nucleotidase in breast cancer cells treated with hydroalcoholic *U. tomentosa*. This decrease in the enzymatic activity reduces the amount of adenosine generated, maintaining a larger amount AMP levels. It is known that adenosine promotes tumor proliferation and AMP is an inhibitor of tumor growth, as can be concluded that the treatments conducted with *U. tomentosa* appear to inhibit tumor proliferation by reduction in 5'-nucleotidase activity.

In this manner, we suggest that the association of *U. tomentosa* 500µg/mL with the doxorubicin has shown promise regarding the activities of ectoenzymes. The increased activity of NTPDase can generate a larger amount of AMP in the extracellular medium, which exerts an opposite effect of adenosine by inhibiting tumor growth. The activity of ecto-5'-nucleotidase was shown to be inhibited in cells that received this combined treatment. Thus, we suggest that by inhibiting the activity of ecto-5'-nucleotidase in the treatment, Doxo+Ut500 may inhibit tumor growth.

Additionally, the increased expression of ecto-5'-nucleotidase has been observed in breast cancer, as compared with the nonmalignant surrounding tissue. In the present study, we observed a high expression level of CD73 (Figure 3B), consistent with Spsychala et al. (2004) who reported a higher expression level of CD73 in ER-negative than in ER-positive breast cancer cells.

Although we found a significant reduction in CD73 activity, the expression of this enzyme exhibited no significant difference between the study groups. Only the Ut500 and Ut500+Doxo groups, without any difference, displayed a tendency to reduce this expression when compared to the control group, and as a result it could be associated with a inhibition of ecto-5'-nucleotidase by *U.tomentosa* in these groups.

The activity of ectonucleotidases varies between different tumor types. According to the study performed by STELL et al. (2010), different bladder tumor cell lines were able to metabolize nucleotides with a distinct pattern of extracellular hydrolysis. The less malignant RT4 cell line revealed high levels of ATP and ADP hydrolysis, while AMP hydrolysis remained low. In contrast, the T24 line that represents an invasive tumor exhibited a markedly decreased capacity in hydrolyzing both ATP and ADP, along with a high capacity to hydrolyze AMP. These reports indicate that a possible relationship between malignancy and the altered profile of ectonucleotidases activities may also exist in bladder tumor cells, as it is seen in the brain (Canbolat et al., 1996) and other tumor cells (Durak et al., 1993, 1994).

Loi et al. (2013) showed that the high CD73 expression that is associated with the resistance to doxorubicin therapy in TNBC, and the TNBC patients with high CD73 expression have a higher risk of distant metastasis. In addition, their data revealed that CD73-mediated immunosuppression suppress the therapeutic activity of doxorubicin in vivo. Furthermore, CD73 inhibition potentiated the CD8-dependent anti-tumor immune response following doxorubicin treatment. We can thus suggest that somehow *U. tomentosa* inhibits the activity of CD73 of which could contribute to a successful treatment with doxorubicin.

Studies have shown that doxorubicin is the greatest up-regulation of CD73 and CD39 expression in human melanoma (A2058), leukemia (RPMI 8226) and breast cancer cells (MDA-MB-231) (Loi et al., 2013). This suggests that some chemotherapy drugs have the role of changing the enzyme cascade that converts the ATP to immunosuppressive adenosine. In our study, doxorubicin did not alter the expression of CD39 and CD73 in the MDA-MB-231 cells in 24 treatments. The expression of CD39 increased in the Ut250 and Ut250 + Doxo groups compared to the control group, since the CD73 expression was significantly lower in the Ut500 group when compared to the cells treated group only with doxorubicin.

Our results revealed in the expression of the A1 adenosine receptor in MDA-MB231 cells, but when these cells received different types of treatment there was a significant increase in the expression of the A1 receptor, except in the Ut 500 + Doxo group in which A1 the receptor expression levels remained similar to those of the control group.

The A1 receptor adenosine has been associated to carcinogenesis in previous investigations where the expression of this receptor has been demonstrated in colorectal adenocarcinoma (Khoo et al., 1996). The antitumor activity of the adenosine A1 receptor has been reported as reducing tumor proliferation in glioblastoma cancer cells and MCF-7 breast cancer. Additionally, evidence of pro-tumor action has been observed increasing cell proliferation in breast cancer cells MDA-MB-468 (TNBC) (Mirza et al., 2005; Gessi et al, 2011). Nevertheless, little is known about the expression and activity of this receptor in the MDA-MB-231 breast cancer cells.

The role of hypoxia in regulating tumor progression is controversial (Burnstock and Di Virgilio, 2013). However, in the MCF-7 and the MDA-MB-231 breast cancer cell lines, the expression of the P2X7 receptor is increased by hypoxia (Tafani et al., 2011). In addition, there is increased expression of P2X7 receptors in breast tissue undergoing malignant change (Slater et al., 2004; Tafani et al., 2011). The increased expression of P2X7 receptors by hypoxia enhances invasion and migration of tumour cells (Burnstock and Di Virgilio, 2013).

Studies have shown that emodin is a potent P2X7 antagonist, which suppressed the invasiveness of breast and lung cancer ((Burnstock and Di Virgilio, 2013; Jelassi et al., 2013). This evidence indicates an important role for the P2X7 receptors in mediating cancer cell metastasis, the major cause for high mortality (Roger et al., 2014).

In our study, the untreated MDA-MB-231 cell group showed high density of the P2X7 receptor. This receptor density presented a significant reduction when cells were only treated with *U. tomentosa* and when this was associated with doxorubicin (Figure 4B). Notably, the Ut500+Doxo group had performed better once again.

Finally, the present study suggests that *U. tomentosa* 500µg/mL alone or associated with doxorubicin can reduce tumor proliferation by inhibiting the ecto-5'-nucleotidase, reducing the amount of adenosine which is generated by hydrolysis of nucleotides through ectoenzymes. The combination of treatments (Ut500 + Doxo) expressed greater reduction in density of the P2X7 receptor, demonstrating that the effect of the hydroalcoholic extract *U. tomentosa* can be effective when combined with chemotherapy.

5 Conclusions

Therefore, we conclude that hydroalcoholic extract of *Uncaria tomentosa* to inhibit the activity of ecto-5'-nucleotidase may be contributing to prevent tumor progression, because reduces conversion AMP in adenosine, and adenosine is a tumor proliferative agent. In addition, *U. tomentosa* extract also altered the expression of purinergic receptors. The role of the A1 receptor expression in MDA-MB-231 cells is unclear. The reduction in P2X7 receptor expression can reduce the chance of tumor invasion and metastasis. Our results showed a significant influence of the *Uncaria tomentosa* extract on enzymes and receptors purinergic system, which could contribute to the reduction of tumor progression. And also indicate that the combined *Uncaria tomentosa* and doxorubicin may be promising effects on the purinergic system.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Herbarium Botanic Laboratory.

References

- Araújo, M. C. S., Farias, I. L., Gutierrez, J., Dalmora, S. L., Flores, N., Farias, J., De Cruz, I., Chiesa, J., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C., 2012. *Uncaria tomentosa* – Adjuvant treatment for Breast Cancer: Clinical Trial. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012, 8 pages. Doi: 10.1155/2012/676984
- Beaumont, T., Leadbeater, M., 2011. Treatment and care of patients with metastatic breast cancer. *Nurs Stand* 2011. 25, 49-56.
- Bertol, G., Franco, L., De Oliveira, B. H., 2012. HPLC analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: sample preparation and analysis optimisation by factorial design. *Phytochemical Analysis*. 23, 143–151.
- Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., Van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, M. C., Gelmon, K., Nielsen, T. O., Blomqvist, C., Heikkilä, P., Heikkinen, T., Nevanlinna, H., Akslen, L. A., Bégin, L. R., Foulkes, W. D., Couch, F. J., Wang, X., Cafourek, V., Olson, J. E., Baglietto, L., Giles, G. G., Severi, G., McLean, C. A., Southey, M. C., Rakha, E., Green, A. R., Elis, I. O., Sherman, M. E., Lissowska, J., Anderson, W. F., Cox, A., Cross, S. S., Reed, M. W. R., Provenzano,

- E., Dawson, S. J., Dunning, A. M., Humphreys, M., Easton, D. F., García-Closas, M., Caldas, C., Pharoah, P. D. 2010. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Medicine*. 7, 1-12.
- Burnstock, G., Di Virgilio, F., 2013. Purinergic signaling and cancer. *Purinergic Signalling*. 9, 491-540.
- Burnstock, G., Knight, G. E., 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology*. 240, 31-304.
- Cailleau, R., Olivé, M., Cruciger, Q.V., 1978. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In vitro* 14, 911-915.
- Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Analytical Biochemistry*. 157, 375-380.
- Cianfrocca, M., Goldstein, L., 2004. Prognostic and Predictive Factors in Early Stage Breast Cancer. *Breast*. 9, 606-616.
- Conbolat, O., Durak, I., Cetin, R., Kavutcu, M., Demirci, S., Ozturk, S., 1996. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast Cancer Research Treatment*. 37, 189–193.
- De Martino, L., Martinot, J. L. S., Franceschelli, S., Leone, A., Pizza, C., De Feo, V., 2006. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 107, 91–94.
- Dreifuss, A.A., Bastos-Pereira A.L., Ávila, T.V., Soley, B., Rivero, A.J., Aquilar, J. L., Acco, A. 2010. Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. *Journal of Ethnopharmacology*. 130, 127–133.
- Duarte, J. M., R. A. Carvalho, Cunha, R. A., Gruetter, R., 2009. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Neurochemistry*. 111, 368-379.
- Durak, I., Isik, A.C., Canbolat, O., Akyol, O., Kavutcu, M. 1993. Adenosine deaminase, 5'- nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human laryngeal tissues, *Free Radical Biology & Medicine*. 15, 681–684.
- Durak, I., Perk, H., Kavutcu, M., Canbolat, O., Akyol, O., Beduk, Y. 1994. Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues. *Free Radical Biology & Medicine*. 16, 825–831.

Elias, A.D., 2010. Triple-negative breast cancer: a short review. *American Journal of Clinical Oncology*. 33, 637-645.

Engel, L.W., Young, N.A., 1978. Human breast carcinoma in continuous culture: a review. *Cancer Research*. 38, 4327-4339.

Farias, I., Araújo, M.C., Zimmermann, E.S., Dalmora, S.L., Benedetti, A.L., Alvarez-Silva, M., Asbahr, A.C.C., Bertol, G., Farias, J., Schetinger, M.R.C., 2011. *Uncaria tomentosa* stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells. *Journal Of Ethnopharmacology*. 137, 856-863.

Fernandez, Y., Cueva, J., Palomo, A.G., Ramos, M., De Juan, A., Calvo, L., Garcia-Mata, J., Garcia-Tejido, P., Pelaez, I., Garcia-Estevez, L., 2010. Novel therapeutic approaches to the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 36, 33-42.

Foulkes W. D.; Smith I.E.; Reis-Filho, J.S., 2010. Triple-negative breast cancer. *The new England Journal of Medicine*. 363, 1938-1948.

Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C., Borea, P. A., 2011. Adenosine receptors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808, 1400-1412.

Gewirtz, D. A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*. 57, 727–741.

Heitzman, M. E., Neto, C. C., Winiarz, E., Vaisberg, A. J., Hammond, G. B., 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. 66, 5-29.

Jelassi, B., Anchelin, M., Chamouton, J., Cayuela, M. L., Clarysse, L., Li, J., Gore, J., Jiang, L. H., Roger, S., 2013. Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. *Carcinogenesis*. 34, 1487–1496.

Jin, H., Eun, S.Y., Lee, J.S., Park, S. W., Lee, J.H., Chang, K.C., Kim, H.J. 2014. P2Y₂ receptor activation by nucleotides released from highly metastatic breast cancer cells increases tumor growth and invasion via crosstalk with endothelial cells. *Breast Cancer Research*. 16, 70-77.

Keplinger, K., Laus, G., Weerm, M., Dierich, M. P., Teppner, H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.- Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 23–34.

Khoo, H.E., Ho, C.I, Chhatwal, V.J., Chan, S.T., Ngoi, S.S., 1996. Differential expression of adenosine A1 receptors in colorectal cancer and related mucosa. *Cancer Letters*. 106, 17-21.

Laus, G., Brössner, D., Keplinger, K., 1997. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry*. 45, 855– 860.

Loi, S., Pommey, S., Haibe-Kains, B., Beavis, P.A., Darcy, P.K., Smyth, M.J., 2013. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *PNAS*. 110, 11091-11096.

Marméa, F., Schneeweissa, A. Targeted Therapies in Trppli-Negative Breast Cancer, *Breast Care*. 10, 159-166.

Mazurek, S., Michel, A., Eigenbrodt, E., 1997. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *The Journal of Biological Chemistry*. 27, 4941-4952.

Mirza, A., Basso, A., Black, S., Maldkowski, M., Kwee, L., Patcher, J. A., Lachowicz, J. E., Wang, Y., Liu, S., 2005. RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*. 12, 1355-1360.

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S., 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*. 59, 365–378.

Oliveira, L.Z., Farias, I.L., Rigo, M.L., Glanzner, W.G., Gonçalves, P.B., Cadoná, F.C., Cruz, I.B., Farias, J.G., Duarte, M.M., Franco, L., Bertol, G., Colpo, E., Brites, P.C., Rocha, J.B, Leal, D.B., 2014. Effect of *Uncaria tomentosa* Extract on Apoptosis Triggered by Oxaliplatin Exposure on HT29 Cells. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*. 16, 70-77.

Osborne C.K., 1990. Prognostic factors in breast cancer. *Principles & Practice of Oncology*. 4, 1-11.

Ozer, H., Armitage, J. O., Bennett, C. L., Crawford, J., Demetri, G. D., Pizzo, P. A., Schiffer, C. A., Smith, T. J., Somlo, G., Wade, J. C., Wade, J. L. 3rd, Winn, R. J., Wozniak, A. J., Somerfield, M. R., 2000. 2000 Update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. *Journal of clinical Oncology*. 18, 3558-3585.

Philp, R.B., 2004. Herbal–Drug Interaction and Adverse Effects. An Evidence-based Quick Reference Guide. *The Journal of the Canadian Chiopractic Association*. 50, 292-335.

Pilarski, R., Filip, B., Wietrzy, K. J., Kuras, M., Gulewicz, K., 2010. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine*. 17, 1133-1139.

Pilarski, R., Poczekaj-Kostrzewska, M., Ciesiołka, D., Szyfter, K., Gulewicz, K., 2007. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Pharmacological Reports*. 59, 565–572.

Pilarski, R., Zielinski, H., Ciesiolka, D., Gulewicz, K., 2006. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*. 104, 18-23.

Reiner, A., Neumeister, B., Spona, J., Reiner, G., Schemper, M., Jakesz, R., 1990. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Research*. 50, 7057-7061.

Riva, L., Coradini, D., Di Fronzo, G., De Feo, V., De Tommasi, N., De Simone, F., Pizza, C., 2001. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. *Anticancer Research*. 21, 2457–2461.

Rizzi, R., Re, F., Bianchi, A., De Feo, V., De Simone, F., Bianchi, L., Stivala, L.A., 1993. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 38, 63-77.

Roger, S., Jelassi, B., Couillin, I., Pelegrin, P., Besson, P., Jiang, L.H., 2014. Understanding the roles of the P2X7 receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1848, 2584-2602.

Rosales-Hernandez, M. C., Bermúdez-Lugo, J., Garcia J., Trujilloferrara, J., Correa-Basurto, J., 2009. Molecular Modeling Applied to Anticancer Drug Development. *Anticancer Agents in Medical Chemistry*. 9, 230-238.

Sheng, Y., Akesson, C., Holmegren, K., Bryngelsson, C., Giamapa, V., Pero, R. W., 2005. An active ingredient of cat's claw water extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 96, 577-584.

Sheng, Y., Bryngelsson, C., Pero, R. W., 2000. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 69, 115–126.

Sheng, Y., Pero, R.W., Amiri, A., Bryngelsson, C., 1998. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Research*. 18, 3363–3368.

Slater, M., Barden J.A., 2004. Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Research and Treatment*. 83, 1-10.

Spychala, J., 2000. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & Therapeutics*. 87, 161-173.

Spychala, J., Lazarowski, E., Ostapkowicz, A., Ayscue, L. H., Jin, A., Mitchell, B. S., 2004. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 10, 708-717.

Stagg, J., Divisekera, U., Mclaughlin, N., Sharkey, J., Pommey, S., Denoyer, D., Dwyer, K.M., Smyth M.J., 2010a. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 107, 1547–1552.

Stagg, J., Smyth, M.J., 2010b. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 29, 5346-5358.

Stella, J., Bavaresco, L., Braganhol, E., Rockenbach, L., Farias, P.F., Wink, M.R., Azambuja, A.A., Barrios, C.H., Morrone, F.B., Battastini, A.M.O. Differential ectonucleotidases expression human bladder câncer cell lines. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 28, 260-267.

Tafari, M., Schito, L., Pellegrini, L., Villanova, L., Marfe, G., Anwar, T., Rosa, R., Indelicato, M., Fini, M., Pucci, B., Russo, M.A . 2011. Hypoxia-increased RAGE and P2X7R expression regulates tumor cell invasion through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF- κ B. *Carcinogenesis*. 32, 1167–1175.

Tokunaga, E., 2006. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. *International Journal of Cancer*. 118, 284–289.

Urrea, F.A., Cordova-Delgado, M., Pessoa-Mahana, H., Ramírez-Rodríguez, O., Weiss-Lopez, B., Ferreira, J., Araya-Maturana, R., 2013. Mitochondria: a promising target for anticancer alkaloids. *Current Topics Medical Chemistry*. 17, 2171-2183.

Wang, L., Zhou, X., Zhou, T., Ma, D., Chen, S., Zhi, X., Yin, L., Shao, Z., Ou, Z., Zhou, P., 2008. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*. 134, 365-372.

White, N., Burnstock, G., 2006. P2 receptors and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27, 211-217.

Xu, G., Mcleod, H. L., 2001. Strategies for enzyme/Prodrug cancer therapy. *Clinical Cancer Research*. 7, 3314-3324.

Zimmermann, H., 1992. 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *The Biochemical Journal*. 285, 345-354.

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*. 52, 44–56.

4.2 MANUSCRITO I

Apresentado na forma de manuscrito, já nas normas para submissão ao periódico **Anticancer Research**.

***Uncaria tomentosa* improves responses to tamoxifen in the purinergic signaling in MCF-7 cells**

Karen F Santos, Jessié M Gutierrez, Micheli M Pillat, Werner G Glanzner, Maria do Carmo S Araújo, Gustavo Bertol, Fabiano B Carvalho, Paulo Bayard Gonçalves, Maria Rosa C Schetinger, Vera Maria Morsch

***Uncaria tomentosa* improves responses to tamoxifen in the purinergic signaling in MCF-7 cells**

Karen F Santos^{a,b*}, Jessié M Gutierrez^a, Micheli M Pillat^a, Werner G Glanzner^c, Maria do Carmo S Araújo^d, Gustavo Bertol^e, Fabiano B Carvalho^a, Paulo Bayard Gonçalves^c, Maria Rosa C Schetinger^a, Vera Maria Morsch^{a*}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, CCNE, Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima, Building 18, Zip code 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartment of Health Sciences, University Regional Integrated, Zip code 98400-000, Frederico Westphalen, RS, Brazil

^cDepartment of Postgraduate Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima, Building 97, Zip code 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^dSanta Maria University Hospital, Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima, Santa Maria, RS, Brazil

^eHerbarium Laboratório Botânico, LTDA, Curitiba, Brazil.

* Corresponding author:

Dra. Karen Freitas Santos: Department of Health Sciences, Integrated Regional University (URI), Zip code 98400-000, Frederico Westphalen, RS, Brazil. E-mail address: karenf1003@gmail.com Tel: +55 -55-9908-1434.

Dra. Vera Maria Morsch: Department of Biochemistry and Molecular Biology, CCNE, Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima, Building 18, Zip code 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail address: veramorsch@gmail.com. Tel: +55 -55-3220-8978.

Abstract

Background: *Uncaria tomentosa* (UT) is a perennial vine commonly found in Central and South America, which has been used as an alternative therapy in treatment of various diseases, including breast cancer, the most common cancer in women. Usually, the therapy for breast cancer is based on the expression of estrogen receptors (ER) by tumor. Our research group has found that dry UT extract reduces neutropenia caused by chemotherapy. Thus, we sought to determine the influence of UT in regulation of extracellular nucleotides, important molecules involved in cancer progression.

Material and Methods: The regulation of extracellular nucleotide metabolism was investigated by determining the activity and expression of ectonucleotidases in a breast cancer cells line [MCF-7 (ER +)] treated with UT, tamoxifen or estradiol.

Results: UT inhibited the activity of ecto-5'-nucleotidase, reducing adenosine levels and reversing the effect on the activity of this enzyme triggered by estradiol. As well as UT and tamoxifen association reduced the activity of ecto-5'-nucleotidase when compared to control group.

Conclusions: UT can exert influence as a down regulator of ecto-5'-nucleotidase. However, it remains unclear the understanding of its relationship to the purinergic system.

Key-Words: *Uncaria tomentosa* – breast cancer – ectonucleotidases – treatment

1. Introduction

Uncaria tomentosa (Willd. ex Roem. & Schult.) DC. (UT) is a perennial vine (tropical liana) which belongs to Rubiaceae family of Angiosperms. Popularly known as cat's claw due to its morphological traits (1), is commonly found in the Central and South America, mainly in the Amazon rainforest. Its therapeutic use is usually accomplished through aqueous extracts of stems and roots, indicated for treatment of ulcers, arthritis and other inflammatory conditions (2,3). Furthermore, UT has

currently been administered by means of diverse excipients (e.g. tea, tablets or capsules) as an alternative treatment for various diseases, including breast cancer (4,5). Some phytochemical studies have shown more than 50 chemical constituents in UT, such as tetracyclic and pentacyclic oxindole alkaloids (1, 2). Some studies have reported antiproliferative activity of UT extract in human lymphoblastic leukemic cells (6) and human tumor cell lines (HeLa, MCF-7 and OSA cells) (7) through induction of apoptosis, which was related to the alkaloid present in the extract.

Breast cancer is the most common cancer in women. This disease is routinely classified by stage, pathology, grade and estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) or human epidermal growth factor receptor (Her2 /neu) expression (8, 9). In addition, it has shown a positive relationship between the presence of hormone receptors and a more favorable prognosis for cancer (10,11). In solid tumors, such as breast cancer, may occur conditions of acute or chronic hypoxia, resulting in necrosis, cellular lysis and consequent release of adenine nucleotides and nucleosides, increasing purines in extracellular space (13). In addition, these signaling molecules promote inflammatory process, toxicity and tumor progression in breast cancer (13).

To regulate the extracellular content and the signaling mediated by these nucleotides, there is a group of extracellular enzymes anchored to cell membrane surface called ectonucleotidases. These enzymes promote the extracellular catabolism of adenine nucleosides and nucleotides by means of hydrolysis processes. The hydrolysis of ATP (adenosine triphosphate) and ADP (adenosine diphosphate) to AMP (adenosine monophosphate) is catalyzed by ecto-NTPDase/CD39 (14,15). Next, AMP formed is hydrolyzed to adenosine by the action of ecto-5'-nucleotidase/CD73 (16).

The release of extracellular ATP in response to cell death or chronic hypoxia in the tumor environment activates immune responses (17). However, the hydrolysis ATP into adenosine, a potent immunosuppressor, acts as a negative-feedback mechanism to prevent excessive inflammation and tissue damage. Adenosine is generated in response to hypoxia, and it mediates its biological effects through purinergic receptors (A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3). Extracellular adenosine accumulates in cancerous tissues and constitutes an important mechanism of tumor immune scape (18).

Ecto-5'-nucleotidase is expressed in many different tumor cells (bladder cancer, melanoma, breast cancer and others) and its enzymatic product has been described as an important molecule (adenosine) in cancer progression, involved in the control of cell growth, maturation, differentiation, and drug resistance control (12,19). In addition, the excess of adenosine can affect the tumor growth by modulating purinergic receptors type P1, including A₁ and A_{2A} receptors, known to be involved in tumor proliferation and cell cycle activation (20, 21).

In this regard, the regulation of extracellular nucleotides has become an important therapeutic target in studies related to breast cancer. In the same way, the ectonucleotidases activity is an important tool for maintaining the concentration extracellular of these molecules (17,23). Moreover, previous studies carried out by our research group through a randomized clinical trial found that 300 mg of UT reduced deleterious effects of chemotherapy; as well as the neutropenia induced by chemotherapy in breast cancer patients (5).

This study aims to investigate the effects of UT, 17- β -estradiol and tamoxifen on purinergic signaling in MCF-7 breast cancer cells. In order to perform this, it was verified the effect of the UT hydroalcoholic extract on cell death markers and the activity and expression of purinergic system-related enzymes (CD39 and CD73) in MCF-7 cells.

2. Methods

2.1 *U. tomentosa* (UT) extract

UT extract (5 %) was prepared by ultra-turrax extraction (Biotron-Kinematica AG) of ground bark of plants from Peru (Naturex) with 70 % ethanol (Dipalcool). The fluid was centrifuged (Centrifuge Suzuki), concentrated in a heating tank (MCA-ALW) to remove the alcohol, and spray-dried (Kohls) using silicon dioxide (Evonik) and microcrystalline cellulose 102 (Blanver) as excipients. The *U. tomentosa* extract was gently donated by Herbarium Laboratório Botânico, Curitiba, Brazil.

2.2 Analysis of dry UT extract

The following reagents were used: acetonitrile (JTBaker), triethylamine (Fluka), acetic acid (JTBaker), polyamide (Fluka), ethanol (Vetec), and ultrapure water.

Sample extraction was performed by using a Unique ultrasound, model USC 5000A, at 40 kHz. Chromatographic analyses were performed on the Agilent 1100 HPLC system and a Zorbax XDB C-18 column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 µm Agilent) at 15°C. Samples (80 mg) were diluted in 60 % ethanol (10 mL) and subjected to sonication (20 min at 30°C). Next, 2 mL of sample were filtered through a column containing 200 mg of polyamide, and the eluate was injected into an HPLC system. Separation was achieved using gradient elution of water (0.2 % acetic acid) adjusted to pH 6.9 with triethylamine (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.8 mL/min. Detection was performed at 245 nm, and the concentration of oxindole alkaloids (OA) was calculated according to previously described by Bertol and coworkers (24).

2.3 Cell culture

MCF-7, human breast cancer cell line (ER+), cells were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank - BCRJ (Code BCRJ: 0162). Cells were cultured and frozen in liquid nitrogen for storage. Subsequently, they were grown in Eagle's culture medium, modified according to Dulbecco: Nutrient mixture (DMEM-F12) (Sigma Chemical Co., Italy) and supplemented with 100 UI/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 0.25 µg/mL of amphotericin and 10% of fetal bovine serum (FBS, Cultilab). Cells were cultured in bottles and maintained at 5% CO₂ and 37°C until the formation of cell monolayer. After, cells were subjected to trypsinization.

2.4 Cell treatments

For enzyme assays and cell viability cells were seeded in 24-multiwell plates at densities of 1×10^4 cells/well in a final volume of 1 mL of Eagle's culture medium, modified according to Dulbecco (DMEM without phenol red) (Sigma Chemical Co., Italy). For flow cytometry cells were seeded on a surface area of 25 cm² at densities of 1×10^6 cells in a final volume of 5 mL of culture medium, allowed to adhere overnight at 37°C. Cells were treated with UT (250 µg/mL and 500 µg/mL), 17-β-estradiol (1 µM) and tamoxifen (10 µM) (Sandoz, SP), a triphenylethylene derivate and selective oestrogen receptor modulator (SERM), for 24 h has described: control (untreated cells); Ut250 (UT 250 µg/mL); Ut500 (UT 500 µg/mL); Tam (Tamoxifen 10 µM); Est (17-β-Estradiol 1 µM); Ut250/T (UT 250 µg/mL + tamoxifen 10 µM); Ut500/T (UT 500 µg/mL + tamoxifen 10 µM); Ut250/E (UT 250 µg/mL + 17-β-Estradiol 1 µM);

Ut500/E (UT 500 µg/mL + 17-β-Estradiol 1 µM); Ut250/T/E (UT 250 µg/mL + tamoxifen 10 µM + 17-β-Estradiol at 1 µM); Ut500/T/E (UT 500 µg/mL + tamoxifen 10 µM + 17-β-Estradiol 1 µM) groups.

2.5 Cellular viability evaluation by trypan blue and MTT assays

For trypan blue analysis, cells were harvested by incubation for 5 min with 0,05 % (w/V) trypsin (Sigma) in Hanks buffered solution (Gibco/Invitrogen) containing 0.3 mmol/L EDTA followed by the addition of 10% FBS (Cultilab) to inactivate the trypsin. Cells were quantified using a Neubauer chamber and cellular viability was assessed by using trypan blue exclusion method.

Cell viability was also evaluated using MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (Sigma) reduction assay. Cells were treated as previously described and incubated for 24 h. Cells were washed with culture medium and MTT (0.5 mg/mL) was added to each well. Cells were incubated for a further period of 2.5 h and then carefully washed with PBS. DMSO (200 µL) was added to each well and absorbance was read at 595 nm.

2.6 Enzymatic assay

MCF-7 cells were washed 3 times with phosphate-free incubation medium in the absence of substrate. The reaction was started by the addition of 200 µL of the incubation medium containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM CaCl₂ for ecto-NTPDase assay and 2 mM MgCl₂ for determining ecto-5'-nucleotidase. Reaction was started by adding ATP, ADP or AMP to the reaction medium to a final concentration of 2.0 mM and the incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was stopped by removing an aliquot (150 µL) of the incubation medium and transferring into a tube containing 150 µL TCA 10% previously placed on ice. The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by malachite green method (25), using KH₂PO₄ as a Pi standard. Controls to correct non-enzymatic hydrolysis of nucleotides were performed by measuring the Pi released into the same reaction medium incubated without cells. All assays were performed in triplicate. Activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.7 Protein determination

Cells in the 24 multiwell plates were dried and solubilized with 100 μ L of NaOH 1N and frozen overnight. An aliquot of 50 μ L token and the protein was measured by the Comassie blue method, using bovine serum albumin as standard.

2.8 Flow citometry

Following treatment, MCF-7 cells were trypsinized, dissociated and counted immediately in a hemocytometer. Then, 1×10^6 cells were centrifuged for 5 min at 400 x *g* and washed twice with phosphate buffered saline (PBS) plus 3% fetal bovine serum (FBS). The sediments were suspended and incubated for 30 min with purified mouse anti-human CD39 and anti-human CD73 antibody (BD Pharmingen TM) (1:10). The same number of cells was incubated without antibodies. All samples were washed with PBS and immediately analyzed by flow cytometry (BD ACCURI C6) and FlowJo software.

2.9 Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc* test. Differences between mean values were considered significant at $p < 0.05$, using Graph Pad Prism 5.

3. Results

3.1 Analysis of *Uncaria tomentosa* extract by HPLC

Figure 1 shows the HPLC analysis of dry UT extract. It was observed a content of 4,20% oxindole alkaloids (OA) quantified as the sum of speciophylline (peak 1), uncarine F (peak 2), mitraphylline (peak 3), rhynchophylline (peak 4), isomitraphylline (peak 5), uncarine C (peak 6), isorhynchophylline (peak 7), and uncarine E (peak 8).

3.2 MCF-7 cell viability after incubation with *Uncaria tomentosa*, estradiol e tamoxifen.

Figure 2 shows MCF-7 viable cells using trypan blue (2A and 2B) and MTT reduction (2C and 2D).

Ut250, Ut250/E, Tam and Ut250/T groups reduced the number of trypan blue negative cells compared to control group, as we can see in Figure 2A. Est group did not change the number of negative cells to trypan blue. The association between UT 250 µg/mL and EST also showed a reduction in the number of trypan blue negative cells, indicating that EST did not prevent death induced by UT 250 µg/mL. A similar effect was observed using a UT 500 µg/mL (Figure 2B). Ut500, Ut500/E, Ut500/T and Ut500/T/E reduced the number of trypan blue negative cells. The UT500/T association also reduced the number of trypan blue negative cells. And the presence of estradiol in the culture medium did not prevent death induced by UT 500 µg/mL. The association between UT250/T/E did not show a significant reduction in cell viability (2A), however, UT500/T/E decreased by trypan negative cells compared to the control (2B).

The graphics 2C and 2D show that UT 250 and 500 µg/ml significantly decreased the MTT reduction. The effects of UT extract isolated and in association with Tam and/or estradiol was confirmed by MTT method which reproduced the antiproliferative effect found in viability by trypan blue. Except UT250/T/E group that showed reduced viability only by MTT.

3.3 Ecto-NTPDase activity in the MCF-7 cells after incubation with Uncaria tomentosa, estradiol and tamoxifen.

Figure 3 shows the effects of UT, EST and TAM on the NTPDase activity using ATP and ADP as substrate. Figure 3A shows the hydrolysis of ATP. Its was observed an increased in ATP hydrolysis in Est, UT250/E and UT250/T/E groups compared to control group. The same effect was observed in Figure 3B Est, Ut500/E and UT500/T/E. The activity of ATP hydrolysis increased when estradiol was added into the culture medium compared to control group. UT at both concentrations and TAM showed no effect *per se* on hydrolysis of this nucleotide. Moreover, the association of EST with UT and UT with TAM, at both concentrations, did not prevent the increase of hydrolysis of ATP induced by EST (3A and 3B).

When we used ADP as a substrate for the enzyme NTPDase, unlike what happened with ATP, in Ut250 (Figure 3C) and Ut500 (Figure 3D) groups, ADP hydrolysis was significantly lower in control group. Estradiol added to the culture medium of MCF-7 cells triggered an increase in ADP hydrolysis. TAM did not showed

effect *per se* in the hydrolysis of ADP. In UT250/T/E and Ut500/T/E groups association of UT and tamoxifen did not prevent the increase in ADP hydrolysis induced by Est (3C and 3D).

3.4 Ecto-5'-nucleotidase activity in the MCF-7 cells after incubation with Uncaria tomentosa, estradiol and tamoxifen.

Figure 4 shows the effect of UT, EST and TAM on AMP hydrolysis in MCF-7 cells. It was observed a reduction in AMP hydrolysis induced by the UT 250 (4A) and 500 (4B) µg/mL. Estradiol added to the culture medium of MCF-7 cells triggered an increase the 5'-nucleotidase activity. TAM showed no effect *per se*. The association of EST with UT and UT with TAM showed a protective effect on the increase in AMP hydrolysis induced EST.

3.5 Number of to CD39 and CD73 positive cells in MCF-7 after treatment with Uncaria tomentosa, estradiol and tamoxifen.

No significant differences were observed between the groups for the CD39 positive cells (5A). However, UT 250 µg/ml increased the number of CD73 positive cells (5B). Graph 5C shows the distribution of cells by Dot Plot.

4. Discussion

Among the species of *Uncaria* gender, the type *tomentosa* is the one with the highest concentration of indole and oxindole alkaloids (1,26). The oxindole alkaloids (pentacyclic and tetracyclic) are responsible for the pharmacological properties of UT (1, 2, 26). The extract used in this study has in its constitution pentacyclic oxindole alkaloids (POA) and tetracyclic oxindole alkaloids (see figure 1). Bacher and colleagues (2005) tested individually the oxindole alkaloids of UT and observed an inhibition of proliferation of human leukemic lymphoblast cells and induction of apoptosis in these cells (6). These findings are in accordance with De Martino and colleagues (2006) that reported an apoptosis-induction in human tumor cells as MCF-7, SAOS, HeLa lines (7). Besides, our research group has found that treatment with a daily dose of 300mg of dry UT extract was capable to reducing neutropenia caused by chemotherapy in patients with breast cancer (5). Based on these results,

the aim of this study was to investigate through *in vitro* experiments with MCF-7 cells and the hydroalcoholic extract of UT, since this extract has anti-proliferative effects in tumor cells.

Several factors are related to the development of breast cancer. Estrogen, an essential female hormone, is an important factor in the growth and differentiation of the female reproductive system tissues. However, studies conducted *in vitro* and *in vivo* showed that 17- β -estradiol is involved in the development of breast cancer, such as stimulating the proliferation of tumor cells (27, 28) as well as inhibitor of apoptosis (29). In our study, no significant reduction in the viability was observed when 17- β -estradiol (1 μ M) administered in 24 hours of incubation. However, Chow and collaborators (2004) found that different concentrations of 17- β -estradiol (0.1-500 nM) at different times of incubation had no significant changes in cell viability in MCF-7, although the concentration of 1000nM (1 μ M) of 17- β -estradiol showed a reduction in cell viability time dependent (30). Our findings clearly showed that both the concentrations of UT 250 μ g/mL and 500 μ g/mL were able to reduce the MCF-7 cells viability in the MTT assay and method of trypan blue, clearly demonstrating an anti-proliferative effect of the hydroalcoholic extract of UT (Figure 2).

Currently, the regulation of extracellular nucleotides has become an important therapeutic target in studies of breast cancer, and the search for agents that regulate this signaling system is an important tool for research on breast cancer.

It has become increasingly evident that purinergic system has an important role in the proliferation and development of breast cancer. A study of human breast adenocarcinoma suggests that cell surface ATPase plays important roles in tumor cell migration, drug resistance and anti-tumor immune response (31, 32). In addition, CD73 (also known as ecto-5'-nucleotidase) facilitates the adhesion, migration and invasion of human breast carcinoma T-47D and MB-MDA-231 cell lines via generation of adenosine (19). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis (31). This study focused mainly in the nucleotide catabolism by ectonucleotidases in MCF-7 cells, and was observed that UT extract (250 μ g/mL and 500 μ g/mL) and 17- β -estradiol were able to significantly increase the ecto-NTPDase activity, using ATP and ADP as substrate (Figure 3 A-D). Interestingly, both concentration of UT reduced ecto-NTPDase (using ADP) and ecto-5'-nucleotidase activities, which suggest that UT stimulated these enzymes most

preferably to production of AMP than adenosine. Furthermore, the concentration of UT 250 ug/mL with TAM seems to be more effective for the reduction of ecto-5'-nucleotidase activity in comparison with the UT 500ug/ml with TAM (Figure 4 A-B).

Tamoxifen, often used to treat breast cancer positive to estrogen receptor (ER+), was shown to increase the expression of CD73 in MCF-7 cells where incubated for 48 hours with TAM 1 μ M (13). Despite this effect, it is known that this compound reduces the expression of the regulatory protein kinase, cyclin D1, maintaining stagnant tumor cells in the G1 phase of the cell cycle (31, 33). In our study we used a higher concentration of TAM (10 μ M) with 24 hours of incubation, and we found that TAM *per se* do not alter the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities, only in ecto-5'-nucleotidase activity in the presence of UT250 μ g/ml.

While 17- β -estradiol significantly increases ecto-5'-nucleotidase, considerably increasing adenosine levels, both extract concentration significantly reduce adenosine levels. In contrast to adenosine, AMP, the precursor of adenosine, has an inhibitory effect in the growth of breast cancer cells (34, 35). In agreement with this results, increased expression of ecto-5'-nucleotidase has been observed in breast cancer in comparison with nonmalignant tissue surrounding (36). It is known that adenosine in high concentrations can decrease natural killer cell capacity (NK) cells to produce tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ), as well as prevent the lytic activity of NK cells, thereby limiting the activity of NK cells on tumor cell lysis (37).

Thus, it is possible to suggest that UT could be reducing adenosine levels, favoring the antitumor immune response, besides its immuno-stimulatory activity, which was found that this extract is able to increase the phagocytic activity of macrophages and granulocytes from human and to stimulate endothelial cells to secrete factors which leads to the proliferation of T and B lymphocytes (1,38). Although there was no significant differences in the expression of both CD39⁺ and CD73⁺ in MCF-7 cells in all experimental groups, reports in the literature on CD73 expression describe an increase of CD73 is directly related to a worse prognosis of breast cancer and inversely related to the expression of ER⁺ (13, 39, 40). Moreover, the CD73 expression appears to be higher in MDA-MB231 cells than in MCF-7 cells (40) which may explain our data for CD73 expression in MCF-7 cells.

Based in our findings, we suggest that even in supra-physiological 17- β -estradiol levels the UT extract was able to reduce the activity of ecto-5'-nucleotidase. Thus, UT can exert through down regulation of ecto-5'-nucleotidase one of the mechanisms for their anti-proliferative effect of tumor cells. However, more studies are needed to confirm the effects of UT on tumor cells of breast cancer and the relationship with the purinergic system.

Conflicts of Interest statement

There are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Herbarium Botanic Laboratory.

References

- 1 Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, and Teppner H: *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.--ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of ethnopharmacology* 64: 23-34, 1999.
- 2 Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, and Hammond GB: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 66: 5-29, 2005.
- 3 Steinberg PN: [Cat's Claw: an herb from the Peruvian Amazon]. *SIDAhora : un proyecto del Departamento de Publicaciones del PWA Coalition*, NY: 35-36, 1995.
- 4 Pilarski R, Filip B, Wietrzyk J, Kuras M, and Gulewicz K: Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17: 1133-1139, 2010.
- 5 Santos Araujo Mdo C, Farias IL, Gutierrez J, Dalmora SL, Flores N, Farias J, de Cruz I, Chiesa J, Morsch VM, and Chitolina Schetinger MR: *Uncaria tomentosa*-Adjuvant Treatment for Breast Cancer: Clinical Trial. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2012: 676984, 2012.
- 6 Bacher N, Tiefenthaler M, Sturm S, Stuppner H, Ausserlechner MJ, Kofler R, and Konwalinka G: Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. *British journal of haematology* 132: 615-622, 2006.
- 7 De Martino L, Martinot JL, Franceschelli S, Leone A, Pizza C, and De Feo V: Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. *Journal of ethnopharmacology* 107: 91-94, 2006.
- 8 Beaumont T and Leadbeater M: Treatment and care of patients with metastatic breast cancer. *Nursing standard* 25: 49-56, 2011.
- 9 Fernandez Y, Cueva J, Palomo AG, Ramos M, de Juan A, Calvo L, Garcia-Mata J, Garcia-Tejido P, Pelaez I, and Garcia-Estevez L: Novel therapeutic approaches to the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer treatment reviews* 36: 33-42, 2010.

- 10Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkila P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Begin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS, Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, Garcia-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, and Huntsman D: Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine* 7: e1000279, 2010.
- 11Osborne CK: Prognostic factors for breast cancer: have they met their promise? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 10: 679-682, 1992.
- 12Spychala J: Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & therapeutics* 87: 161-173, 2000.
- 13Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, and Mitchell BS: Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10: 708-717, 2004.
- 14Robson SC, Seigny J, and Zimmermann H: The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2: 409-430, 2006.
- 15Zimmermann H: Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Foundation symposium* 276: 113-128; discussion 128-130, 233-117, 275-181, 2006.
- 16Zimmermann H: 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *The Biochemical journal* 285 (Pt 2): 345-365, 1992.
- 17 Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, and Rebe C: Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012: 473712, 2012.
- 18Hasko G and Cronstein BN: Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in immunology* 25: 33-39, 2004.
- 19Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, and Zhou P: Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* 134: 365-372, 2008.
- 20 Gessi S, Merighi S, Varani K, and Borea PA: Adenosine receptors in health and disease. *Advances in pharmacology* 61: 41-75, 2011.
- 21Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz JE, Wang Y, and Liu S: RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer biology & therapy* 4: 1355-1360, 2005.
- 23Ghiringhelli F, Rebe C, Hichami A, and Delmas D: Immunomodulation and anti-inflammatory roles of polyphenols as anticancer agents. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 12: 852-873, 2012
- 24Bertol G, Franco L, and Oliveira BH: HPLC analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: sample preparation and analysis optimisation by factorial design. *Phytochemical analysis : PCA* 23: 143-151, 2012.

- 25 Chan KM, Delfert D, and Junger KD: A direct colorimetric assay for Ca²⁺ - stimulated ATPase activity. *Analytical biochemistry* 157: 375-380, 1986.
- 26 Laus G: Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. *Phytotherapy research* : PTR 18: 259-274, 2004.
- 27 Lippman M, Bolan G, and Huff K: The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer research* 36: 4595-4601, 1976.
- 28 Lippman M, Bolan G, and Huff K: Interactions of antiestrogens with human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer treatment reports* 60: 1421-1429, 1976.
- 29 Kyprianou N, English HF, Davidson NE, and Isaacs JT: Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer research* 51: 162-166, 1991.
- 30 Chow SK, Chan JY, and Fung KP: Suppression of cell proliferation and regulation of estrogen receptor alpha signaling pathway by arsenic trioxide on human breast cancer MCF-7 cells. *The Journal of endocrinology* 182: 325-337, 2004.
- 31 Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, Dwyer KM, and Smyth MJ: Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 1547-1552, 2010.
- 32 Zhang X, Gao F, Yu LL, Peng Y, Liu HH, Liu JY, Yin M, and Ni J: Dual functions of a monoclonal antibody against cell surface F1F0 ATP synthase on both HUVEC and tumor cells. *Acta pharmacologica Sinica* 29: 942-950, 2008.
- 33 Bryant HU: Selective estrogen receptor modulators. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. Holanda 3: 231-241, 2002.
- 34 Hugo F, Mazurek S, Zander U, and Eigenbrodt E: In vitro effect of extracellular AMP on MCF-7 breast cancer cells: inhibition of glycolysis and cell proliferation. *Journal of cellular physiology* 153: 539-549, 1992.
- 35 Mazurek S, Michel A, and Eigenbrodt E: Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *The Journal of biological chemistry* 272: 4941-4952, 1997.
- 36 Canbolat O, Durak I, Cetin R, Kavutcu M, Demirci S, and Ozturk S: Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast cancer research and treatment* 37: 189-193, 1996
- 37 Raskovalova T, Huang X, Sitkovsky M, Zacharia LC, Jackson EK, and Gorelik E: Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *Journal of immunology* 175: 4383-4391, 2005.
- 38 Wurm M, Kacani L, Laus G, Keplinger K, and Dierich MP: Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. *Planta medica* 64: 701-704, 1998
- 39 Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, and Stagg J: CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 11091-11096, 2013.
- 40 Zhou Q and Davidson NE: Silencing estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer biology & therapy* 5: 848-849, 2006.

Figures

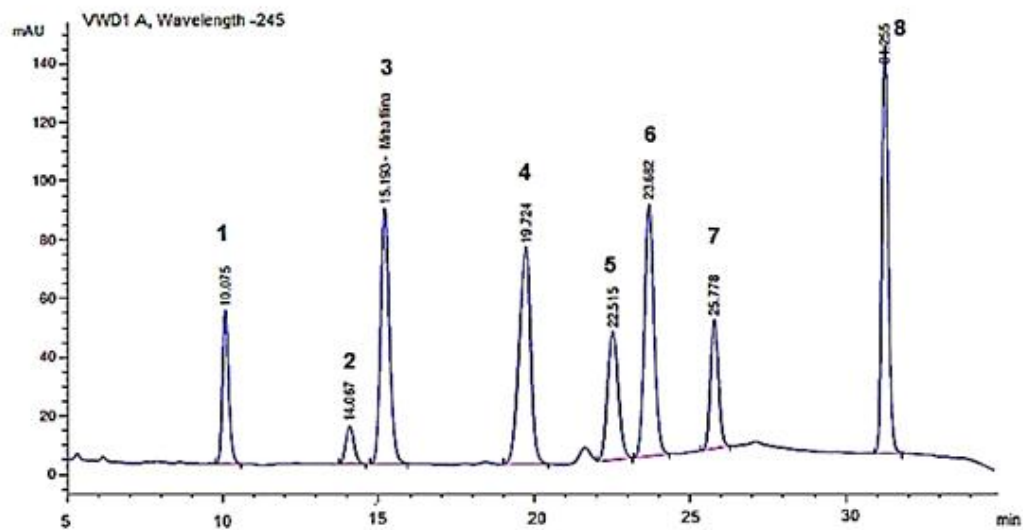


Figure 1. HPLC-Fingerprint analysis of dry extract from *Uncaria tomentosa*. 1- Speciophylline (10.075 min), 2- Uncarine F (14.067 min), 3- Mitraphylline (15.193 min), 4- Rhynchophylline (19.724 min), 5- Isomitraphylline (22.515 min), 6- Uncarine C (23.682 min), 7- Isorhynchophylline (25.778 min), and 8- Uncarine E (31.255 min).

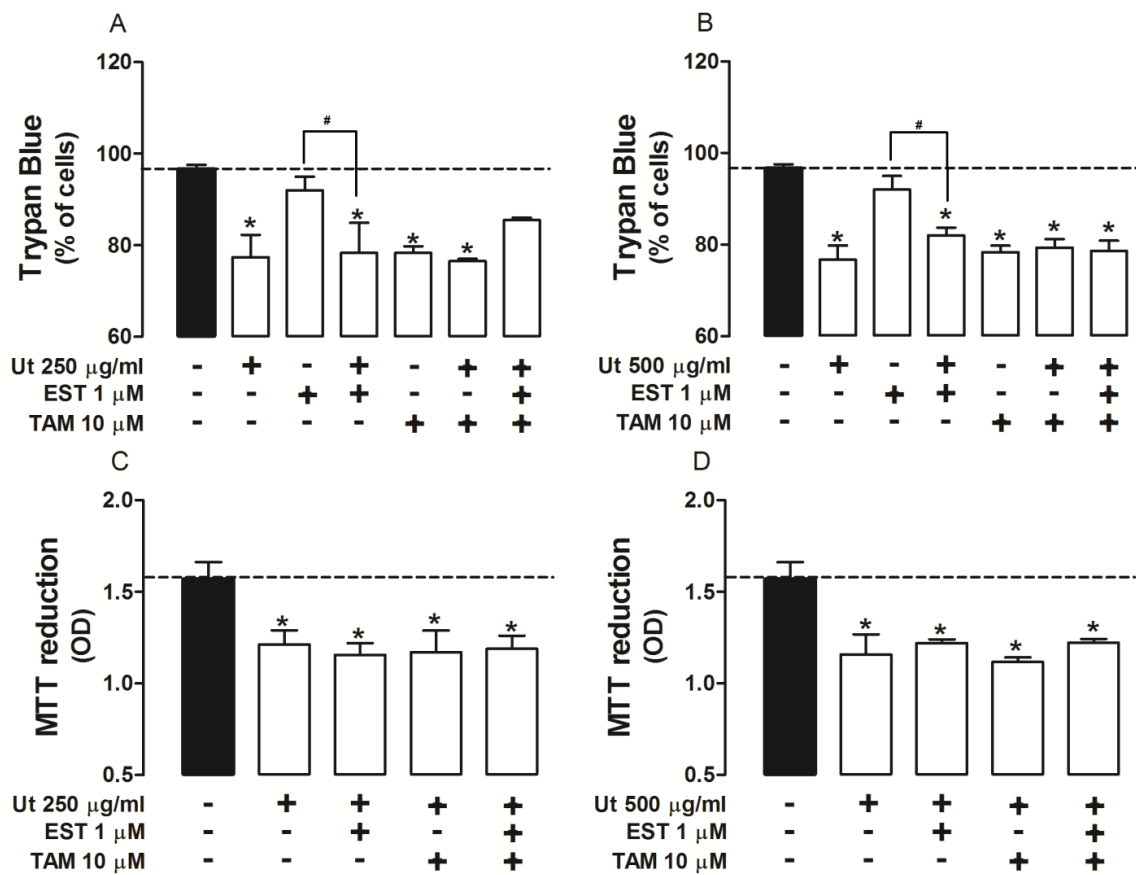


Figure 2. Effects of *Uncaria tomentosa* (UT, 250 and 500 μ g/ml), estradiol (EST, 1 μ M) and tamoxifen (TAM, 10 μ M) on trypan blue negative cells (A and B) and MTT reduction (C and D) in the MCF-7 cell viability. *Denotes significant difference versus vehicle group (n=3, independent experiments). # denotes significant difference with EST group. One-way ANOVA followed by post hoc Tukey Test.

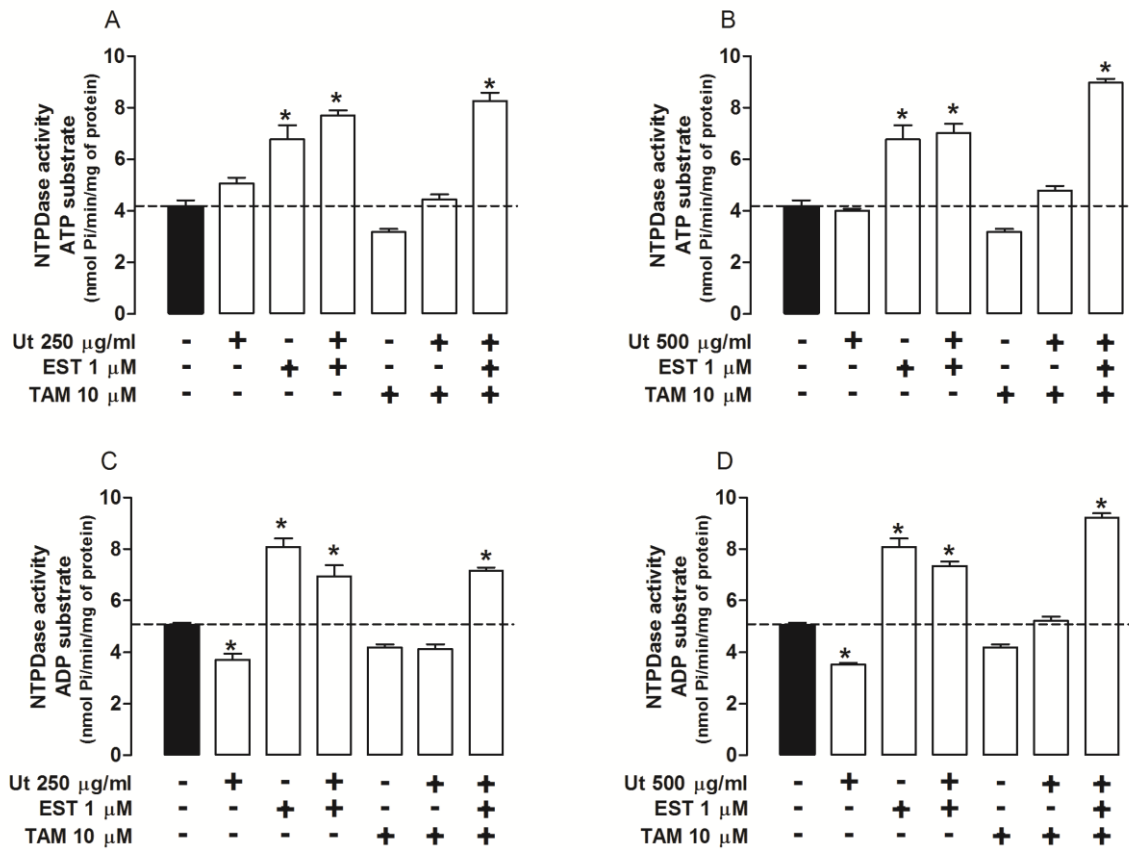


Figure 3. Effects of *Uncaria tomentosa* (UT, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$), estradiol (EST, 1 μM) and tamoxifen (TAM, 10 μM) on 5'-nucleotidase activity using ATP (A and B) and ADP (C and D) as substrate. Bars represent mean \pm SEM. *Denotes significant difference *versus* vehicle group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey Test.

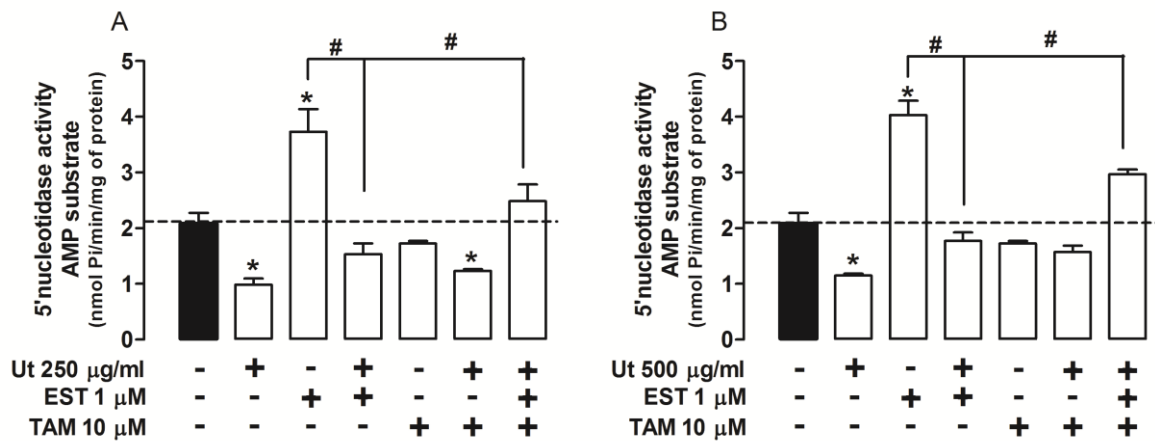


Figure 4. Effects of *Uncaria tomentosa* (UT, 250 and 500 µg/ml), estradiol (EST, 1 µM) and tamoxifen (TAM, 10 µM) on NTPDase activity using AMP (A and B) as substrate. Bars represent mean \pm SEM. * Denotes significant difference versus vehicle group (n=3 independent experiments). # denotes significant difference with EST group. One-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey Test.

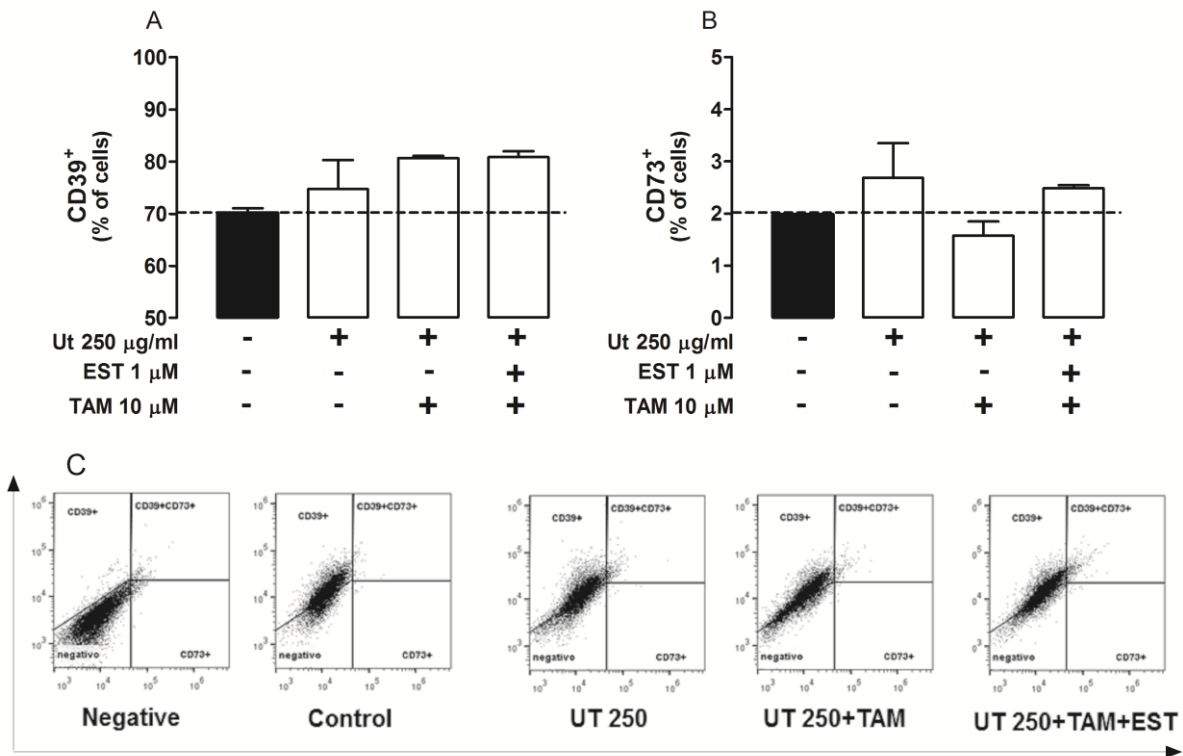


Figure 5. Effects of *Uncaria tomentosa* (UT 250 $\mu\text{g/ml}$), estradiol (EST, 1 μM) and tamoxifen (TAM, 10 μM) on CD39+ (A) and CD73 (B) cells expression. (C) Dot blot of CD39 and CD73 expression in MCF-7 cells. Bars represent mean \pm SEM. * Denotes significant difference *versus* vehicle group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey Test.

5 DISCUSSÃO

O uso de fitoterápicos, compostos a base de plantas ou derivados vegetais, com finalidade profilática, paliativa ou curativa é crescente no mundo (OMS, 2010). Estes medicamentos são utilizados, inclusive, para tratar o câncer, ou então, para minimizar os efeitos adversos da quimioterapia (ENDGAL; NILSEN, 2009).

A *Uncaria tomentosa* (UT) é uma planta com inúmeras propriedades farmacológicas, muitas destas relacionadas principalmente aos alcaloides oxindólicos (SANDOVAL et al., 2000; HEITZMAN et al., 2005). Foi descrita pela primeira vez em 1830, mas começou a despertar o interesse científico somente em 1970, quando se iniciaram os estudos científicos, especialmente na Europa, que acabaram comprovando o seu valor terapêutico (KEPLINGER et al., 1999). Estudos já relacionaram as atividades farmacológicas aos alcaloides isolados (BACHER et al., 2005), bem como aos extratos brutos, o que indica que possa estar ocorrendo um sinergismo dos compostos químicos encontrados na UT (DREIFUSS et al., 2010; 2013).

O Herbarium é um laboratório farmacêutico referência em fitoterápicos no Brasil desde 1985, o qual produz medicamentos a base de UT. Este laboratório forneceu comprimidos de extrato seco de UT para uma pesquisa clínica envolvendo pacientes com câncer de mama, realizado pelo nosso grupo de estudo. Por meio desta pesquisa, comprovou-se que o tratamento diário com este fitoterápico foi eficaz ao reduzir a neutropenia induzida pela quimioterapia (ARAÚJO et al., 2012). Bem como, reduziu da viabilidade das células de câncer de mama, MCF-7, tratadas com UT nas concentrações 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1000 µg/mL por 48h (ARAÚJO, 2013).

Neste estudo, nos propusemos a realizar a avaliação do extrato hidroalcoólico de UT em linhagens de câncer de mama, nas concentrações de 250 µg/mL e 500 µg/mL, verificando o efeito deste extrato sobre a atividade e expressão de enzimas do sistema purinérgico, sistema o qual está envolvido no processo de progressão tumoral. O extrato hidroalcoólico foi escolhido em virtude de já ter demonstrado uma variedade de efeitos como: mieloproliferação (FARIAS et al., 2011) e, principalmente, indução da apoptose em células neoplásicas (DE MARTINO et al., 2006; PILARSKY et al., 2010) assim como estes efeitos já foram relatados para os

alcaloides oxindólicos pentacíclicos isolados, e efeitos anti-tumorais (DREIFUSS et al., 2013).

Um metabólito importante que está relacionado com a progressão tumoral é a adenosina (SPYCHALA et al., 2004). A adenosina pode ser gerada a partir do AMP, sendo que este é produto do catabolismo gradual do ATP e do ADP, num processo catalisado, principalmente, por uma enzima do sistema purinérgico ecto-NTPDase1/CD39. A conversão de AMP em adenosina é realizada da ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ZIMMERMANN, 2001). Além de favorecer a progressão tumoral, a adenosina, também, pode facilitar a migração de células tumorais (*in vitro*) e metástases (*in vivo*) através da ativação de receptores purinérgicos do subtipo A_{2A} (STAGG et al., 2010) e, também, possui ação imunossupressora. Desta forma, a terapia anti-CD73 pode ser uma alternativa eficaz em combinação com outras estratégias terapêuticas para inibir a metástase do câncer de mama e favorecer a resposta imune antitumoral (STAGG et al., 2010).

O câncer de mama é uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica e biológica, onde os tumores podem apresentar semelhança histológica, porém, diferentes prognósticos e respostas terapêuticas (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007; CIANFROCCA et al., 2009; POLIAK, 2011). Tais diferenças que podem ser justificadas pela variedade de subtipos moleculares do carcinoma mamário (PEROU et al., 2000). Desta forma, escolhemos trabalhar com os subtipos moleculares que são semelhantes ao pior e ao melhor prognóstico do câncer de mama, basal-like (MDA-MB-231) e luminal-A (MCF-7), respectivamente (SUBIK et al., 2010; LACROIX et al., 2004).

O extrato hidroalcoólico de UT, utilizado neste estudo, apresentou 4,20% de alcaloides oxindólicos, que foram quantificados como speciofilina, uncarina F, mitrafilina, rincofilina, isomitrafilina, uncarina C, isorincofilina e uncarina E (Figura 1, de ambos manuscritos). A presença de alcaloides oxindólicos é exclusiva do gênero *Uncaria* (PILARSKI et al., 2006; 2007; 2010), comprovando assim a autenticidade do extrato.

Comparado a outros tipos de câncer, o triplo negativo, MDA-MB-231, corresponde de 15 a 20% de todos os casos de câncer de mama, e é caracterizado como o de pior prognóstico e com aumento do risco de metástase (FOULKES et al.,

2010). Para este tipo de câncer, o tratamento é considerado um desafio na prática clínica (IRSHAD et al., 2011).

Inicialmente, buscamos determinar a viabilidade das células tumorais (MDA-MB-231) tratadas com o extrato de UT por 24 horas (tempo utilizado em todos os experimentos desta tese), através das atividades das desidrogenases mitocondriais, quando então, verificamos que a viabilidade das células tumorais diminuiu quando foram tratadas com UT (Figura 1B – Artigo científico I). Podendo, com base nesta metodologia, confirmar o efeito antiproliferativo da UT, já relatado por outros autores como Garcia e col. (2007) em células de neuroblastoma e células de leucemia promielocítica (PILARSKI et al., 2007). A doxorrubicina, uma antraciclina com ação citotóxica e indutora da resposta imune antitumoral (GALLUZZI et al., 2012), comumente utilizada de forma isolada ou em associação nos tratamentos quimioterápicos, também reduziu a viabilidade celular tanto sozinha, como quando associada a UT.

Dando continuidade, avaliamos a atividade da ecto-NTPDase-1/CD39 e o perfil de expressão desta enzima. Verificamos que a UT adicionada ao meio de cultura das células MDA-MB-231, em ambas as concentrações testadas (250 µg/mL e 500 µg/mL), não foi capaz de alterar a atividade enzimática da ecto-NTPDase em relação ao grupo de células não tratadas (Figura 2A e 2B – Artigo científico I). Porém, ao compararmos o grupo que recebeu tratamento associado de UT 500 µg/mL com o quimioterápico doxorrubicina, a atividade da ecto-NTPDase foi significativamente maior em relação ao grupo tratado apenas com UT 500 µg/mL, utilizando o ATP e o ADP como substrato. O aumento na atividade da ecto-NTPDase nesse grupo (UT 500 µg/mL/doxorrubicina), pode favorecer a geração de AMP no meio extracelular, o qual ao contrário da adenosina, é essencial para inibir o crescimento tumoral (MAZUREK et al., 1997).

Observando o grupo de células MDA-MB-231 incubadas apenas com o meio de cultura, verificamos que a expressão da CD39 é baixa nesse tipo de linhagem celular. Já quando, adicionamos o extrato de UT 250 µg/mL ao meio de cultura das células MDA-MB-231 e, o extrato UT 250 µg/mL associado a doxorrubicina, observamos um aumento na expressão da CD39 em relação ao grupo controle (Figura 3A – Artigo científico I). Embora, tenhamos verificado o aumento da

expressão da CD39 nas células MDA-MB-231 desses grupos (UT 250 µg/mL e UT 250 µg/mL/Doxorrubicina) não houveram alterações nas atividades enzimáticas.

Loi et al. (2013) relatam que a doxorrubicina, e outros quimioterápicos, exercem um efeito de *up-regulation* das enzimas CD39 e CD73 em linhagens de câncer de mama, como a MDA-MB-231. Em nosso estudo não se observou isso. Infere-se isso ao tempo de incubação e concentração da doxorrubicina utilizadas por nós.

A ecto-NTPDase/CD39, hidrolisa os nucleotídeos ATP e ADP até o AMP, o qual é então, hidrolisado pela ecto-5'-nucleotidase até adenosina. Então, buscamos avaliar a atividade da ecto-5'-nucleotidase na linhagem MDA-MB-231 e, detectamos que essa foi significativamente inibida pelo extrato de UT adicionado ao meio de cultura, em ambas as concentrações (250 µg/mL e 500 µg/mL), comparando ao grupo controle (Figura 2C – Artigo científico I). O grupo de células MDA-MB-231 tratadas apenas com o quimioterápico também reduziu a atividade enzimática em relação ao grupo não tratado. Além disso, quando associamos a UT, nas duas concentrações (250 µg/mL e 500 µg/mL) com a doxorrubicina observamos uma significativa inibição enzimática. Embora sem diferença significativa, ao associarmos os extratos de UT com a doxorrubicina, as médias de Pi (fosfato inorgânico) encontradas foram menores nos grupos UT 250 µg/mL/doxorrubicina (0,279 nmol Pi/min/mg de proteína) e UT 500 µg/mL/doxorrubicina (0,330 nmol Pi/min/mg de proteína) comparando com o grupo tratado apenas com a doxorrubicina (0,788 nmol Pi/min/mg de proteína).

De acordo com Canbolat et al. (1996), o aumento da atividade da ecto-5'-nucleotidase, parece promover o crescimento de células de câncer de mama. Em nosso estudo, foi significativa a redução da atividade da ecto-5'-nucleotidase nas células MDA-MB-231 tratadas com o extrato hidroalcoólico de UT (250 µg/mL e 500 µg/mL) isolado ou associado à doxorrubicina. Esta redução da atividade enzimática reduz, conseqüentemente, a quantidade de adenosina gerada, mantendo maiores níveis de AMP no meio extracelular.

A expressão de CD73 é maior em células de tumor mamário, em relação ao tecido mamário normal. Esta expressão é inversamente proporcional a expressão de RE, ou seja, mais evidente em células RE negativos em relação às células com RE positivas (SPYCHALA et al., 2004), o que comprovamos através do nosso estudo

(Figura 3B – Artigo científico I). Os grupos tratados apenas com UT, em ambas as concentrações, ou a então, associado com a doxorrubina não alteraram expressão da CD73. O grupo de células MDA-MB-231 tratado apenas com a doxorrubina, manteve a expressão de CD73 semelhante ao grupo de células não tratadas. Porém, a UT 500 µg/mL adicionada ao meio de cultura das células reduziu a expressão da CD73 em relação ao grupo de células tratadas apenas com a doxorrubina. A elevada expressão de CD73 está relacionada com maior risco de metástases assim como, a resistência à terapia com doxorrubina em células triplo negativo, pois a imunossupressão mediada pela CD73 suprime a atividade terapêutica da doxorrubina, que além de efeito citotóxico, também, estimula a resposta imune antitumoral (LOI et al., 2013).

Com base em nossos resultados, e pelos dados descritos na literatura, podemos supor que o extrato hidroalcoólico de UT, 250 µg/mL e 500 µg/mL, possa contribuir para a redução da proliferação tumoral das células MDA-MB-231 através da inibição da atividade enzimática da ecto-5'-nucleotidase, diminuindo no meio extracelular os níveis de adenosina. E, entre os grupos avaliados, podemos propor que a associação de UT na concentração de 500 µg/mL e de doxorrubina, apresenta resultados mais promissores, pois ao aumentar a atividade da ecto-NTPDase pode estar gerando uma maior quantidade de AMP no meio extracelular, a qual exerce um efeito oposto de adenosina por inibição do crescimento tumoral. Assim como, apresenta uma evidente redução da atividade de ecto-5'-nucleotidase.

Tumores sólidos em condições de hipóxia e de necrose liberam ATP e adenosina para o meio extracelular (SPYCHALA, 2000), moléculas as quais estimulam receptores purinérgicos localizados nas membranas celulares (BURNSTOCK, 2007). Receptores do tipo P1 (A1, A2A, A2B e A3), metabotrópicos, sensíveis a adenosina e, receptores do tipo P2: P2X e P2Y, ionotrópicos e metabotrópicos, respectivamente, sensíveis aos nucleotídeos como o ATP e ADP (BURNSTOCK, 1978). A ativação de receptores purinérgicos pelos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, pode estar envolvida no processo carcinogênese, estimulando ou inibindo a proliferação e progressão tumoral, dependendo do tipo de tumor.

A molécula de adenosina, produzida pela atividade da ecto-5'-nucleotidase, está relacionada com diversas atividades biológicas, como a progressão tumoral,

neovascularização (SPYCHALA, 2000), através da ligação a receptores do tipo P1, como o A1 e A_{2A} (BURNSTOCK, 1978; BURNSTOCK, 2007). Com base nessas afirmações, nos propusemos a verificar a expressão do receptor A1, sensível a adenosina, nas células MDA-MB-231 tratadas com UT (Figura 4A – Artigo científico I).

Os extratos de UT na concentração 250 µg/mL adicionado ao meio de cultura das células MDA-MB-231, por 24h, isolado ou associado a doxorrubicina, aumentou a expressão do receptor A1, o mesmo foi verificado para o grupo de células tratadas apenas com o quimioterápico. Já, quando as células foram tratadas com a UT na maior concentração (500 µg/mL) apenas no tratamento isolado observamos o aumento na expressão do receptor, o que não se repetiu no tratamento associado com a doxorrubicina. Na literatura encontramos que a ativação deste receptor pela adenosina pode exercer uma atividade antitumoral em células de glioblastoma e em células de câncer de mama, MCF-7, mas efeito proliferativo nas células de tumor mamário MDA-MB-468. No entanto pouco se sabe sobre a atividade e expressão deste receptor na linhagem utilizada neste estudo, MDA-MB-231.

Considerando que o papel do receptor P2X₇ está relacionada com a transformação maligna dos tecidos, com a invasão tumoral e metástase, no câncer de mama e pulmão (ROGER et al., 2014; JELASSI et al., 2013), nós buscamos verificar a expressão deste receptor na linhagem celular, de pior prognóstico, de câncer de mama, MDA-MB-231. Sabe-se que, em condições de hipóxia, a expressão deste receptor é aumentada nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (TAFANI et al., 2011). Em nosso estudo, confirmamos a elevada expressão deste receptor nas células MDA-MB-231 (Figura 4B – Artigo científico I). No entanto, ao adicionarmos o extrato de UT (250 µg/mL e 500 µg/mL) aos meios de cultura das células MDA-MB-231, de forma isolada ou em associação a doxorrubicina, observamos uma redução significativa na expressão do receptor P2X₇.

O grupo tratado com UT (500 µg/mL) associada a doxorrubicina mostrou a mais baixa expressão do receptor P2X₇ (média 51,46%) em relação aos demais grupos, comparando ao grupo controle. A ativação de receptores purinérgicos depende da disponibilidade de nucleotídeos no meio extracelular, que são controlados pelas ectonucleotidases. O grupo UT 500 µg/mL/doxorrubicina, mostrou um aumento na atividade da ecto-NTPDase, utilizando o ATP e ADP como

substratos, reduzindo desta forma os níveis de ATP no meio extracelular. Com a redução dos níveis de ATP, e a redução da expressão do receptor P2X₇, sensível a esse nucleotídeo, sugerimos que o tratamento associado de UT 500 µg/mL/doxorubicina nas células MDA-MB-231 pode minimizar o processo de invasão tumoral e metástase mediado pelo receptor P2X₇.

Os efeitos da UT em enzimas do sistema purinérgico também foi avaliado em células de câncer mama que expressam receptores hormonais, RE e RP, MCF-7, foco do segundo manuscrito. MCF-7 representa uma linhagem de células com perfil de bom prognóstico, o qual representa em torno de 60% dos casos de câncer de mama. Pacientes com tumores de mama com esse perfil molecular podem responder a terapia hormonal (BUSHATSKY et al., 2015).

ERs desempenham um papel importante na manutenção de processos fisiológicos do tecido mamário. No entanto, eles também são fatores críticos na etiologia e progressão do câncer de mama e, conseqüentemente, são importantes alvos farmacológicos da terapia antineoplásica (PIKE et al., 1993; BUSHATSKY et al., 2015). A perda ou falta de expressão de RE podem também contribuir para uma ampla gama de alterações fenotípicas que ocorrem durante a transição para um câncer de mama mais agressivo e metastático (SPYCHALA et al., 2004).

O estradiol é um hormônio que exerce seu efeito carcinogênico através de mecanismos dependentes de RE e, também, independentes de RE (BHAT et al., 2003). Logo, para os tumores que expressam os RE, a terapia hormonal é indicada. Comumente realizada com tamoxifeno, um modulador seletivo de receptor de estrogênio (SERM), uma das drogas antineoplásicas mais comumente prescritas no mundo, atuando como antagonista do estrogênio na mama (SAAD et al., 2002).

Para este estudo, a linhagem de células MCF-7 foi incubada por um período de 24 horas com extrato de UT 250 µg/mL, 500 µg/mL, bem como com o tamoxifeno e 17-β-estradiol, em tratamento isolado ou associando os tratamentos. Também, em um primeiro momento, avaliamos a viabilidade celular das células MCF-7 após o período de incubação com os tratamentos mencionados.

Pelo método azul de trypan, verificamos que todos os grupos de células MCF-7 que tiveram o extrato de UT (250 µg/mL ou 500 µg/mL) adicionado ao meio de cultura, ou este extrato associado com o tamoxifeno e/ou estradiol, reduziram a viabilidade celular (Figura 2 – Artigo científico I). Assim como, as células com

tamoxifeno adicionado ao meio de cultura, também reduziram a viabilidade celular quando comparamos ao grupo controle (sem tratamento). Em 24 h de incubação com o 17- β -estradiol não verificamos alterações na viabilidade celular, grupo o qual se manteve de forma semelhante ao grupo de células não tratadas. Buscamos confirmar os resultados encontrados pelo método azul de trypan para os grupos de células MCF-7, as quais foram tratadas com extrato de UT, através da atividade das desidrogenases mitocondriais, os quais confirmaram os resultados encontrados pela primeira metodologia. Os mesmos efeitos da UT foram reproduzidos na outra linhagem avaliada, MDA-MB-231.

Ainda, pelo método azul de trypan, foi possível verificar que as células tratadas com UT (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) associadas ao 17- β -estradiol, reduziram a viabilidade celular das células MCF-7, também, comparando com o grupo de células que teve o meio suplementado apenas com o 17- β -estradiol. Podendo sugerir, desta forma, que o extrato de UT nas duas concentrações foi capaz de minimizar os efeitos provocados pelo 17- β -estradiol.

O mecanismo de ação do estrogênio sobre o câncer de mama envolve tanto a promoção da proliferação celular como a prevenção de apoptose (KYPRIANOU et al., 1991). Este hormônio aumenta a taxa de proliferação de células através do recrutamento de células que estão fora do ciclo celular para entrarem no ciclo celular, encurtando o tempo total do ciclo através da redução do tempo na fase G1 e entrada da célula na fase S (BRUNNER et al., 1989, CLARKE et al., 2001). Também, já foi relatada a resistência de fármacos quimioterápicos em células MCF-7 induzida pelo estrogênio, através da *up-regulation* de Bcl-2 a qual é uma proteína anti-apoptótica (TEIXEIRA et al., 1995).

Estudo realizado por Sutherland e col. (1983), avaliou o efeito do tamoxifeno no ciclo celular de células MCF-7, o qual mostra que houve uma redução tempo-dependente (24, 48 e 72 h) na porcentagem de células na fase S do ciclo celular tratadas com 10 μM de tamoxifeno associado a 1 μM de estradiol, enquanto que as células que foram tratadas apenas com 1 μM de estradiol, aumentaram a proporção de células na fase S do ciclo, quando comparado ao grupo controle. Pelo método azul de trypan, as células tratadas com UT, em ambas as concentrações, tiveram resultados semelhantes ao grupo tratado apenas com o tamoxifeno.

Após avaliarmos o efeito do extrato de UT sobre a viabilidade celular, buscamos elucidar os efeitos desse extrato sobre a atividade e expressão das ectonucleotidases. Verificamos que a hidrólise do ATP não sofreu alterações quando as células MCF-7 foram tratadas com o extrato hidro alcoólico de UT (250 µg/mL e 500 µg/mL) já a hidrólise do ADP foi significativamente menor nesses grupos quando comparado ao grupo de células não tratadas (Figura 3 – Artigo científico I).

A atividade da ecto-NTPDase, utilizando o ATP e o ADP como substratos, foi elevada em todos os grupos de células MCF-7 que foram suplementados com 17-β-estradiol, inclusive nos grupos tratados em associação com os extratos de UT (250 µg/mL ou 500 µg/mL) com ou sem tamoxifeno; demonstrando assim que a UT não foi capaz de reverter os efeitos provocados pelo estradiol nas hidrólises de ATP e ADP. As células tratadas com UT (250 µg/mL ou 500 µg/mL) associada ao tamoxifeno não mostraram diferença na hidrólise do ATP e ADP ao compararmos ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com o tamoxifeno (Figura 3 – Manuscrito I).

No entanto, a atividade da ecto-5'-nucleotidase foi significativamente menor nos grupos de células que foram tratadas por 24h com os extratos de UT em ambas as concentrações testadas (250 µg/mL e 500 µg/mL) (Figura 4 – Manuscrito I). Além disso, também se observou a inibição da atividade da ecto-5'-nucleotidase no grupo de células MCF-7 previamente tratadas com UT 250 µg/mL associada ao tamoxifeno 10µM. Os grupos UT250 µg/mL e UT250/Tam/Est reduziram a atividade enzimática da ecto-5'-nucleotidase quando comparado ao grupo tratado apenas com o 17-β-estradiol, desta forma podemos sugerir que a UT pode estar revertendo os efeitos provocados pelo estradiol na atividade da ecto-5'-nucleotidase.

Com base nos resultados encontrados para as atividades enzimáticas nas células MCF-7 tratadas com UT na concentração de 250 µg/mL, realizamos experimentos para avaliar a expressão da CD39 e CD73 nessa linhagem celular. Tendo em vista os resultados expressos por citometria de fluxo, observamos que a linhagem de células tumorais, MCF-7, apresentam uma maior expressão de CD39 e uma pequena expressão de CD73. Conforme Spsychala e col. (2004), a expressão da CD73 é maior em células com RE negativos, o contrário ocorre nas células com RE positivo, nossos resultados, tanto para a linhagem MCF-7 quanto para a MDA-MB-231 corroboram com esses dados.

Não encontramos diferenças significativas nas expressões de CD39 e CD73 quando as células foram tratadas UT 250 µg/mL, nem quando esse tratamento foi associado ao tamoxifeno ou tamoxifeno com 17-β-estradiol. Entretanto o grupo de células MCF-7 tratadas com UT 250 µg/mL e tamoxifeno, embora não significativo, mostrou uma tendência a reduzir a expressão de CD73 em relação ao grupo controle.

Considerando os resultados observados para a linhagem MCF-7, o uso de UT 250 µg/mL isolado ou associado ao tamoxifeno pode favorecer a redução da atividade da ecto-5'-nucleotidase, reduzindo assim, a quantidade de adenosina liberada no meio extracelular. Adenosina, conforme já descrito, favorece a proliferação tumoral pela inibição da resposta imune antitumoral, desencadeada principalmente pela ligação desta molécula ao receptor A_{2A} (RASKOVALOVA et al., 2005).

Em conclusão, o principal achado deste estudo é que a UT modula a atividade enzimática, principalmente da ecto-5'-nucleotidase. Esta enzima está expressa numa variedade de tumores e, o aumento da sua expressão e atividade está relacionado com o aumento da malignidade. Assim, a CD73 é um alvo potencial a ser explorado para a redução da proliferação tumoral. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os efeitos da UT sobre o sistema purinérgico e relacioná-los com a progressão tumoral.

6 CONCLUSÕES

O extrato *Uncaria tomentosa* não altera a atividade da ecto-NTPDase na linhagem MDA-MB-231, já na linhagem MCF-7, reduz apenas a hidrólise de ADP. E, inibe a atividade da ecto-5'-nucleotidase em ambas as linhagens de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. Assim como, altera a expressão de receptores purinérgicos do tipo A1 e P2X7 nas células MDA-MB-231.

Em ambas as linhagens celulares, MDA-MB-231 e MCF-7, os extratos hidroalcoólico de UT (250 µg/mL e 500 µg/mL) inibem a atividade da ecto-5'-nucleotidase/CD73. Assim como, a associação do extrato de UT, nas concentrações 250 µg/mL e 500 µg/mL, com o quimioterápico doxorrubicina favorece a inibição enzimática da ecto-5'-nucleotidase/CD73 na linhagem MDA-MB-231. E, o tratamento associado de UT 250 µg/mL com tamoxifeno, também, favorece a inibição enzimática ecto-5'-nucleotidase/CD73 na linhagem MCF-7.

Apenas os tratamentos com o extrato de UT 250 µg/mL e este, associado a doxorrubicina, aumentam a expressão da CD39 nas células MDA-MB-231. E, a expressão da CD73 não é alterada pelos tratamentos realizados com UT, doxorrubicina e tamoxifeno nas células MDA-MB-231 e MCF-7.

Na linhagem MDA-MB-231, os extratos de UT, em ambas as concentrações, aumentam a expressão dos receptores A1, bem como ocorre com a doxorrubicina. Exceto, quando há associação entre UT 500 µg/mL e doxorrubicina que a expressão do receptor A1, mantêm-se semelhante ao grupo de células não tratadas. Já, na mesma linhagem celular, há uma redução significativa na expressão do receptor P2X7 tanto nos grupos tratados com UT, bem como no grupo doxorrubicina e a associação destes.

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que a UT é capaz minimizar a progressão tumoral através dos seus efeitos antiproliferativos e da modulação do sistema purinérgico. E, por tratar-se de um medicamento fitoterápico, já registrado no Ministério da Saúde e comercializado pela indústria farmacêutica, poderia ser utilizado como um co-adjuvante no tratamento do câncer de mama.

PERSPECTIVAS

- Realizar o estudo de outros receptores purinérgicos (A_{2a} , $P2Y_2$) em cada uma das linhagens celulares;
- Realizar o estudo da apoptose na linhagem MDA-MB-231.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Puriniceptores: are there families of P2X and P2Y puriniceptores? **Pharmacol Ther**, v. 64, p. 445-475, 1994.
- ALLRED, D. C.; MOHSIN, S. K; FUQUA, S. A. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 8, p. 47-61, 2001.
- AQUINO, R. et al. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 453-459, 1991.
- AQUINO, R. et al. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1035-1040, 1997.
- ARAÚJO, M. C. S. et al. *Uncaria tomentosa* – Adjuvant treatment for Breast Cancer: Clinical Trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 8, 2012.
- ARAÚJO, M. C. S. **Uncaria tomentosa: adjuvante no Câncer de Mama**. Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria, 2013.
- ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 36, p. 217-222, 2006.
- BACHER, N. et al. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferation GO/G1- arrested and bcl-2- expressing acute lymphoblastic Leukemia cells. **Bristh Journal of Haematology**, v. 132, p. 615-622, 2005.
- BASTID J. et al. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. **Oncogene**, v. 32, p. 1743-1751, 2012.
- BELESSO, M. et al. Triagem para o tratamento ambulatorial da neutropenia febril. **Rev Bras Hematol Hemater**, v. 32, p. 402-208, 2010.
- BHAT, H. K. et al. Critical role of oxidative stress in estrogen-induced carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 7, p. 3913-3918, 2003.
- BIGONNESSE F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry USA**, v. 43, p. 5511-5519, 2004.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2015.
- BRECCIA, M. et al. Charlson comorbidity index and adult comorbidity evaluation-27 might predict compliance and development of pleural effusions in elderly chronic myeloid leukemia patients treated with dasatinib after resistance/intolerance to imatinib. **Haematologica**, v. 96, p. 1457-1461, 2011.

BRUNNER, N. et al. Endocrine therapy of human breast cancer cells: the role of secreted polypeptide growth factors. **Cancer cells**, v. 3, p. 81-86, 1989.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 671-82, 2008.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. **Circ Res**, v. 58, p. 319-330, 1986.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, p. 1471-1483, 2007.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol**, v. 240, p. 31-304, 2004.

BUSHATSKY, M. et al. Educação em saúde: uma estratégia de intervenção frente ao câncer de mama / Health education: a strategy for action against breast cancer. **Ciência, Cuidade e Saúde**, v. 14, 2015.

BUXTON, I. L.; YOKDANG, N.; MATZ, R. M. Purinergic mechanisms in breast cancer support intravasation, extravasation and angiogenesis. **Cancer Lett**, v. 291, p. 131-141, 2010.

CHENG, A. C. et al. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2206-2218, 2007.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New molecular classifications of breast cancer. **Cancer J Clin**, v. 59 p. 303-13, 2009.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do cancer de mama, **Femina**, v. 39, p. 499-503, 2011.

CLARKE, H. L. et al. Maternal and prepubertal diet, mammary development and breast cancer risk. **J Nutr**, v. 1, p. 154S-157S, 2001.

COGNATO, G. P. **Sistema purinérgico: expressão ontogenética e localização sináptica das ectonucleotidases e seu envolvimento no déficit cognitivo causado por confusão neonatal**. Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

CONBOLAT, O. et al. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 37, p. 189-193, 1996.

DANOVA, M. et al. Tissue and soluble biomarkers in breast cancer and their applications: ready to use? **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 43, p. 75-78, 2011.

DE MARTINO, L. et al. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 91-94, 2006.

DI VIRGILIO, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, v. 72, p. 5441-5447, 2012.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, p. 587-600, 2001.

DINH, P.; DE AZAMBUJA, E.; PICCART-GEBHART, M. J. Trastuzumab for early breast cancer: current status and future directions. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 5, p. 707-717, 2007.

DIXON, C. J. et al. Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P₂-purinoceptors. **Br J Cancer**, v. 75, p. 34-39, 1997.

DREIFUSS, A. A. Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. **J of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 127-133, 2010.

DREIFUSS, A. A. et al. *Uncaria tomentosa* Exerts Extensive Anti-Neoplastic Effects against the Walker-256 Tumour by Modulating Oxidative Stress and Not by Alkaloid Activity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

DUMITRESCU, R.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk -were do we stand in 2005?. **Journal Cell Molecular Medic**, v.9, n. 1, p. 208-221, 2005.

ELLSWORTH, R. E. et al. Correlation of Levels and Patterns of Genomic Instability With Histological Grading of DCIS. **Annals of Surgical Oncology**, v.14, n. 11, p. 3070-3077, 2007.

ENGDAL, S.; NILSEN, O. G. In vitro Inhibition of CYP3A4 by Herbal Remedies frequently used by Cancer Patients. **Phytother. Res**, v. 23, p. 906-912, 2009.

ERLINGE, D.; BURNSTOCK, G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. **Purinergic Signal.**, v. 4, p. 1-20, 2008.

ERNST, E. et al. Traditional remedies and the "test of time". **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 99-100, 1998

FARIAS, I.L. et al. *Uncaria tomentosa* stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells. **Journal of Etnopharmacology**, v. 137, p. 856-863, 2011.

FOLGUEIRA, M. A. A. K. et al. Gene Expression Profile Associated with Response to Doxorubicin-Based Therapy in Breast Cancer. **Clinical Cancer Res**, v. 11, 2005.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S., Triple-negative breast cancer. **The new England Journal of Medicine**, v. 363, p. 1938-1948, 2010.

GALLUZZI, L. et al. Trial Watch: Adoptive cell transfer immunotherapy. **Oncoimmunology**, v. 1, p. 306-315, 2012.

GARCÍA-PRADO et al. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. **Phytomedicine**, v. 14, n. 4, p. 280-284, 2007.

GHIRINGHELLI, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. **Nat. Med.**, v. 15, p. 1170-1178, 2009.

GLOBOCAN/ INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Pharmaceuticals: a review of 117 ESTIMATIVA | 2016 human carcinogens**. Lyon, (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 100E), 2012.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, 2011.

GORDON, J. Extracellular ATP: effects, sources and fate. **Biochemical Journal**, v. 233, p. 309-319, 1986.

GREENBERG, S.; STOPECK, A.; RUGO, H.S. Systemic treatment of early breast cancer: a biological perspective. **J Surg Oncol**, v. 103, n. 6, p. 619-626, 2011.

GREIG, A. V. H. et al. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. **J Invest Dermatol**, v. 121, p. 315-327, 2003.

GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 391-398, 2006.

GUARNERI, V. et al. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 7, p. 1037-1044, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. et al. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HEITZMAN, M. E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 5-29, 2005.

HENNIGHAUSEN, I.; ROBINSON, G. Information networks in the mammary gland. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v. 6, n. 9, p. 715-725, 2005.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Cancer biomarkers. **Molecular oncology**, v. 6, p. 140-146, 2012.

HERSCHKOWITZ, J. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**, v. 8, n. 5, p. 76, 2007.

HOEBERTZ, A.; ARNETT, T. R.; BURNSTOCK, G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 6, p. 290-297, 2003.

HUANG, S. et al. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. **Blood**, v. 90, p. 1600-1610, 1997.

IRSHAD, S.; ASHWORTH, A.; TUTT, A. Therapeutic potential of PARP inhibitors for metastatic breast cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 11, p. 1243-1251, 2011.

JACQUIN, J. P. et al. Docetaxel-containing adjuvant chemotherapy in patients with early stage breast cancer. Consistency of effect in dependent of nodal and biomarker status: a meta-analysis of 14 randomized clinical trials. **Breast Cancer Res Treat**, v. 134, n. 3, p. 903-913, 2012.

JELASSI, B. et al. Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. **Carcinogenesis**, v. 34, p. 1487-1496, 2013.

JIE, H. B. et al. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients. **Br J Cancer**, v. 109, p. 2629-35, 2013.

JIRALERSPONG, S. et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 20, p. 3297-302, 2009.

KEPLINGER, K. et al. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.— Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 23-34, 1999.

KUMAR, S. N. et al. Analysis of proteome changes in doxorubicin-treated adult rat cardiomyocyte. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 5, p. 683-697, 2011.

KYPRIANOU, N. et al. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. **Cancer research**, v. 51, p. 162-166, 1991.

LACROIX, M.; TOILLON, R. A; LECLERC, Q. Stable “portrait” of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. **Endocrine-related cancer**, v. 11, p. 497-522, 2004.

LAUS, G. et al. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 855-860, 1997.

LEMAIRE, I. et al. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (uña de gato). **J of Ethnopharm**, v. 64, p. 109-115, 1999.

LIN, N. U; WINER, E. P. Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 5, p. 798-805, 2008.

- LOI, S. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **PNAS**, v. 110, p. 11091-11096, 2013.
- LUDWIG, H. C. et al. Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. **Anticancer Res**, v. 19, p. 1747-1752, 1999.
- LUI, Z. J. et al. The multiple promoter methylation profile of PR gene and Era gene in tumor cell lines. **Life Sciences**, v. 73, p. 1963-1972, 2004.
- LUKASHEV, D.; SITKOVSKY, M.; OHTA, A. From 'Hellstrom Paradox—to anti-adenosinergic cancer immunotherapy. **Purinergic Signal**, v.3, p. 129-134, 2007.
- MAZUREK, S.; MICHEL, A.; EIGENBRODT, E. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. **J Biol Chem**, v. 8, p. 4941-4952, 1997.
- MENSE, S. M. et al. Estrogen-induced breast cancer: alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 23, p. 78-75, 2008.
- MILLER, M. J. S. et al. Dietary antioxidants protect gut epithelial cells from oxidant-induced apoptosis. **BMC Complement Altern Med**, v. 1, p. 1-11, 2001.
- MULERO, J. J. et al. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. **J. Biol. Chem**, v. 29, p. 20064-20067, 1999.
- NAROD, S. A.; FOULKES, W. D. BRCA1 and BRCA2. **Nature Reviews**, v. 4, p. 665-676, 2004.
- NOWAKOWSKA, J. et al. The effect of *Uncaria tomentosa* bark water extract on chemokinetic activity of spleen lymphocytes in mice. **Central European Journal of Immunology**, v. 34, p. 235-238, 2009.
- OLDENBURG, R. A. et al. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 63, p. 125-149, 2007.
- OMS. Organização Mundial De Saúde. **Cuidados primários de saúde**. Brasília, 1979. 64p. Alma-Ata, 1978
- OMS. Organización Mundial de La Salud. **Situación regulamentaria de los medicamentos: una resena mundial**. Traducción del inglés: Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, 2000. 62p.
- PAGUIRIGAN, A. et al. Mammary stem and progenitor cells: tumour precursors? **Eur J Cancer**, v. 42, n. 9, p. 1225-36, 2006.
- PAYNE, S. J. et al. Predictive markers in breast cancer—the present. **Histopathology**, v. 52, p. 82-90, 2008.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, 2000.

PHILLIPSON, J. D.; HEMINGWAY, S. R.; RIDSDALE, C. E. Alkaloids of *Uncaria*. Part V. **Their occurrence and chemotaxonomy**, v. 41, p. 503-570, 1978.

PIKE, M. et al. Estrogens, progesterons, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. **Epidemiol. Rev**, v. 15, p. 17-35, 1993.

PILARSKI, R. et al. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. **Phytomedicine**, v. 17, n. 14, p. 1133-1139, 2010.

PILARSKI, R. et al. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 18-23, 2006.

PILARSKI, R. et al. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Pharmacol Rep**, v. 39 p. 565-572, 2007.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225-230, 1996.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of clinical**, 2007.

POLYAK, K. Heterogeneity in breast cancer. **J. Clin Invest**, v. 121, n. 10, p. 3786-3788, 2011.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5 p. 68, 2010.

RADICE, D.; REDAELLI, A. Breast cancer management: quality –of -life and cost considerations. **Pharmacoeconomics**, v. 21, n. 6, p. 383-396, 2003.

RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 4, p. 207-211, 2010.

RASKOVALOVA, T. et al. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. **Journal of immunology**, v. 175, p. 4383-4391, 2005.

REINHARD, K. H. *Uncaria tomentosa* (Willd) DC.: Cat`s claw, Una de Gato, or Savéntaro. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 5. p. 143-151, 1999.

RIVA, L. et al. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. **Anticancer Research**, v. 21, n. 4, p. 2457-2461, 2001.

RIZZI, R. et al. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. **J Ethnopharmacol**, v. 38, p. 63-77, 1993.

ROBLES, S. C.; GALANIS, E. Breast cancer in Latin America and the Caribbean. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 11, 2002.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 409-430, 2006.

ROGER, S. et al. Understanding the roles of the P2X7 receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p. 2584-2602, 2014.

ROSS, D. D. et al. Atypical Multidrug Resistance: Breast Cancer Resistance Protein Messenger RNA Expression in Mitoxantrone Selected Cell Lines. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 91, 429-433, 1999.

SAAD, E. D. et al. Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. **Rev bras cancerol**, v. 48, n. 4, p. 555-67, 2002.

SANDOVAL, M. et al. Cat's claw inhibits TNF alpha production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 29, p. 71-78, 2000.

SCHÄFER, R. et al. ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 285, p. 376-385, 2003.

SCHETINGER, M. R. C. et al. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 128. p. 731-741, 2001.

SCHULER, P. J. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD4+ CD39+ FOXP3+ and CD4+ CD39+ FOXP3neg T-cell subsets in cancer patients. **Eur J Immunol**, v. 42, p. 1876-85, 2012.

SHENG, R. et al. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. **Anticancer Research**, v. 18, p. 3363, 1998.

SHENG, Y. et al. An active ingredient of Cat's Claw water extracts. Identification and efficacy of quinic acid. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 96, p. 577-584, 2005.

SHENG, Y. et al. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Molecular Cell**, v. 1, n. 9, p. 459-470, 2002.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Molecular cell**, v. 9, n. 3, p. 459-470, 2002.

SMITH, T. M.; KIRELEY, T. L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. **Biochemica Biophysica Acta**, v. 1386, p. 65-78, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. **Manual de condutas**. 2011.

SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-75, 2004.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-75, 2001.

SPYCHALA, J. et al. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 708-717, 2004.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, p. 161-173, 2000.

STAGG, J. et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, p. 1547-1552, 2010.

SUBIK, K. et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical. Analysis in Breast Cancer Cell Lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, p. 35-41, 2010.

SUTHERLAND, R. L. et al. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 19, p. 615-621, 1983.

TAFANI, M. et al. Hypoxia-increased RAGE and P2X7R expression regulates tumor cell invasion through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF- κ B. **Carcinogenesis**, v. 32, p. 1167-1175, 2011.

TEIXEIRA, C.; REED. J. C.; PRATT, M. A. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 55, p. 3902-3907, 1995.

TIEZZI, D. G. epidemiologia do câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, p. 32-38, 2009.

TURNER, N.; REIS-FILHO, J. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5846-53, 2006.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, v. 7, n. 9, p. 659-672, 2007.

VODUC, K. D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol.**, v. 28, p. 1684-1691, 2010.

WAGSTAFF, S. C. et al. Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced *c-fos* gene expression in MCF-7 breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 2175-2181, 2000.

WANG, L. et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134, p. 365-372, 2008.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, p. 245-262, 2010.

WURM, M. et al. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte proliferation- regulating factor. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 701-704, 1998.

YAGER, J. D. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 270-282, 2006.

ZHI, X. et al. RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. **Clin Exp Metastasis**, v. 24, p. 439-448, 2007.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: Principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. **Nature America Inc**, v. 9, p. 987-988, 1999.

ZIMMERMANN, H.; VOGEL, M.; LAUBE, U. Hippocampal localization of 5'-nucleotidase as revealed by immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 105-112, 1993