

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Patrícia Bernardes Cavalheiro

**CÂNCER DE TIREOIDE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS  
DO SISTEMA PURINÉRGICO, BUTIRILCOLINESTERASE E PERFIL  
OXIDATIVO**

Santa Maria, RS  
2019

**Patrícia Bernardes Cavalheiro**

**CÂNCER DE TIREOIDE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS  
DO SISTEMA PURINÉRGICO, BUTIRILCOLINESTERASE E PERFIL  
OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof. (Dra): Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS  
2019

Cavalheiro, Patrícia Bernardes  
CÂNCER DE TIREOIDE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS  
DO SISTEMA PURINÉRGICO, BUTIRILCOLINESTERASE E PERFIL  
OXIDATIVO / Patrícia Bernardes Cavalheiro.- 2019.  
126 p.; 30 cm

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. Câncer de Tireoide 2. Sistema Purinérgico 3.  
Estresse oxidativo 4. Butirilcolinesterase I. Bitencourt  
Rosa Leal, Daniela II. Título.

**Patrícia Bernardes Cavalheiro**

**CÂNCER DE TIREOIDE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS  
DO SISTEMA PURINÉRGICO, BUTIRILCOLINESTERASE E PERFIL  
OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, da Universidade  
Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como  
requisito parcial para obtenção do Grau de  
**Doutora em Ciências Farmacêuticas.**

**Aprovado em 19 de fevereiro de 2019:**

---

**Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Cleci Menezes Moreira, Dra. (UNIPAMPA)**

---

**Juliana Fleck, Dra. (UFN)**

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)**

---

**Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2019

*“Não faz mal que seja pouco,  
O que importa é que o avanço de hoje  
Seja maior que o de ontem  
Que nossos passos de amanhã  
Sejam mais largos que os de hoje  
Atuem agora e vivam o presente  
Com a certeza de que neste exato instante  
Está se erguendo o futuro  
A dificuldade no momento presente  
Será a glória em seu futuro!”*

*Daisaku Ikeda*

## DEDICATÓRIA

À minha amada mãe Jane  
À minha prima Viviane

À vocês, meus amores, que em muitos momentos  
acreditaram mais em mim do que eu mesma,  
que sustentaram comigo cada minuto de dificuldade e alegria,  
dedico este trabalho e todo o meu amor!

## AGRADECIMENTOS

No momento em que concluo este trabalho, o qual representa uma grande conquista em minha vida, é fundamental agradecer àqueles que foram essenciais para sua concretização.

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder força e coragem para alcançar os meus objetivos e nunca desistir diante dos desafios e insucessos.

À minha família, meus amados pais, Jane, Itacir e Tita, pelos exemplos, apoio e incentivo constantes, pelo amor incondicional e pelas orações. À vocês, hoje e sempre, minha admiração, minha gratidão e meu eterno amor.

Ao meus irmãos, pelo orgulho e apoio.

Ao meu marido, Cláudio, pelo incentivo, apoio, companheirismo, compreensão e amor.

A minha querida orientadora Daniela, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, apoio e carinho.

A todos os colegas do Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada, pela colaboração para a elaboração deste trabalho, pelos momentos compartilhados e pela amizade durante o tempo de convívio.

O meu agradecimento especial aos colegas e amigos Daniela, Paulo Guilherme, Lara e Renata pela amizade, disponibilidade, paciência e ajuda fundamentais para a realização deste trabalho.

A minha profunda gratidão a minha prima, irmã, amiga e anjo Viviane, a qual esteve presente em todos os momentos mais difíceis e importantes ao longo da realização desse trabalho, me auxiliando, incentivando e, por muitas vezes, acreditando mais em mim do que eu mesma. Meu eterno amor e gratidão.

Aos meus amigos de hoje e sempre, que mesmo de longe, me apoiaram, me inspiraram e me deram força para seguir sempre em frente em busca dos meus sonhos.

Aos pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), pela compreensão e disponibilidade em participar deste trabalho, doando não apenas amostras biológicas, mas também experiências de vida. Meus mais sinceros desejos de muita saúde e coragem a todos vocês!

Ao médico Cláudio e aos residentes Aliende, Fernando e Lucas e enfermeira Daiana do ambulatório de cabeça e pescoço do HUSM, muito obrigada pela imensa colaboração.

Aos membros da banca examinadora desta tese, professoras Cleci, Juliana, Liliane e Rosa pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o aprimoramento do mesmo.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade.

E a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, eu gostaria de expressar minha eterna gratidão.



## RESUMO

### **CÂNCER DE TIREOIDE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO, BUTIRILCOLINESTERASE E PERFIL OXIDATIVO**

AUTORA: Patrícia Bernardes Cavalheiro

ORIENTADOR: Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal

**Local e Data da defesa: Santa Maria, 19 de fevereiro de 2019**

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum, cuja incidência vem aumentando nos últimos anos. A melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos na progressão do câncer de tireoide pode auxiliar na identificação de pacientes com carcinomas de baixo e alto risco. Dentre os mediadores capazes de modular processos imunes, tais como a diferenciação celular, destacam-se o ATP, o ADP, o AMP e a adenosina, cujas concentrações extracelulares são controladas pela atividade das ectoenzimas ectonucleosídeo trifosfato 5'-difosfohidrolase (E-NTPDase), E-5'-nucleotidase (E-5'-NT) e adenosina desaminase (ADA), e que agem em receptores específicos, formando o sistema purinérgico. É bem conhecida a relação entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e câncer, na qual as EROs podem contribuir para a transformação neoplásica de células. As EROs são normalmente produzidas por processos oxidativos metabólicos e as moléculas frequentemente danificadas por elas são lipídios, proteínas e o DNA. Os sistemas de defesa antioxidante trabalham cooperativamente para aliviar o estresse oxidativo causado pela produção aumentada das EROs. Qualquer alteração em um desses sistemas pode quebrar esse equilíbrio e causar dano celular e, em última instância, transformação maligna. Além disso, a butirilcolinesterase (BChE) parece desempenhar funções não-colinérgicas importantes, pois é capaz de intervir em processos celulares como a proliferação, diferenciação e apoptose, o que sugere uma possível influência na tumorigênese. O objetivo desse trabalho é a melhor compreensão dos processos moleculares que ocorrem durante a progressão do câncer de tireoide, visando a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos. Para tanto, investigamos o perfil de sinalização purinérgica em pacientes com câncer de tireoide através da determinação, em plaquetas, da atividade das enzimas E-NTPDase e E-5'-NT, além da determinação em plaquetas e no soro da atividade da E-ADA, por espectrofotometria, além do perfil oxidativo, através da dosagem dos níveis de EROs e da avaliação da intensidade do dano biológico causado por eles em lipídios e proteínas, através da determinação da peroxidação lipídica e dos níveis de carbonilação de proteínas. Adicionalmente, verificamos o perfil antioxidante dos pacientes com câncer de tireoide, através da determinação dos níveis de tióis totais (T-SHs) e glutatona reduzida (GSH). A atividade sérica da BChE também foi determinada. Observamos uma significativa redução da atividade da E-NTPDase, tanto na hidrólise do ATP quanto na do ADP. Esses resultados sugerem um aumento da concentração de ATP como consequência de um mecanismo de autoproteção, e ADP, favorecendo alterações tromboembólicas. Contudo, foi observado um significativo aumento da atividade da E-5'-NT, que associada à redução da atividade da ADA, tanto nas plaquetas quanto no soro, conduzem ao aumento da concentração extracelular de adenosina, a qual pode estar envolvida no processo de progressão tumoral. Quanto ao perfil oxidativo, observamos um significativo aumento dos níveis de EROs, que associado a ausência de um aumento concomitante das defesas antioxidantes representadas pelo níveis de T-SHs e GSH, geram um ambiente pró-oxidante que justifica o aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) observados. O aumento significativo da atividade da BChE pode estar relacionado ao estágio de progressão tumoral, visto que os pacientes do estudo apresentavam nódulos pronunciados indicando um estágio mais avançado do câncer. Os resultados descritos demonstram que, durante a progressão do câncer de tireoide, ocorrem alterações tanto na atividade das enzimas do sistema purinérgico e colinérgico quanto no perfil oxidativo desses pacientes. Portanto, tais parâmetros podem representar futuros alvos para a terapia e monitoramento da evolução dessa neoplasia.

**Palavras-chave:** Câncer de Tireoide. Sistema Purinérgico. Estresse oxidativo. Butirilcolinesterase

## ABSTRACT

### **THYROID CANCER: EVALUATION OF PURINERGIC SYSTEM ENZYME ACTIVITIES, BUTYRYLCHOLINESTERASE AND OXIDATIVE PROFILE**

AUTHOR: Patrícia Bernardes Cavalheiro

ADVISOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal

**Place and date of defense: Santa Maria, February 19<sup>th</sup>, 2019**

Thyroid cancer is the most common endocrine neoplasia, and its incidence has been increasing in recent years. A better understanding of the molecular events involved in the progression of thyroid cancer may aid in the identification of patients with low and high-risk carcinomas. Among the mediators capable of modulating immune processes, such as cell differentiation, we highlight ATP, ADP, AMP, and adenosine, whose extracellular concentrations are controlled by the activity of the ectonucleoside triphosphate 5'-diphosphohydrolase (E-NTPDase), E-5'-nucleotidase (E-5'-NT) ectoenzymes and adenosine deaminase (ADA), and which act on specific receptors, forming the purinergic system. It is well known the relationship between reactive oxygen species (ROS) and cancer, in which ROS can contribute to the neoplastic transformation of cells. ROS are normally produced by metabolic oxidative processes and the molecules often damaged by them are lipids, proteins, and DNA. Antioxidant defense systems work cooperatively to relieve oxidative stress caused by increased production of ROS. Any change in one of these systems can break that balance and cause cell damage and, ultimately, malignant transformation. In addition, butyrylcholinesterase (BChE) appears to play important non-cholinergic roles as it is capable of intervening in cellular processes such as proliferation, differentiation, and apoptosis, suggesting a possible influence on tumorigenesis. The objective of this work is a better understanding of the molecular processes that occur during the progression of thyroid cancer, in order to identify possible new therapeutic targets. Therefore, we investigated the purinergic signaling profile in patients with thyroid cancer through platelet determination of E-NTPDase and E-5'-NT enzyme activities, as well as platelet and serum determination of ADA activity, by spectrophotometry. We also investigated the oxidative profile, through the determination of ROS levels and the biological damage caused by reactive species in lipids and proteins by the determination of lipid peroxidation and carbonylation levels of proteins. In addition, we verified the antioxidant profile of thyroid cancer patients by determining the levels of total thiols (T-SHs) and reduced glutathione (GSH). The serum activity of BChE was also performed. We observed a significant reduction in E-NTPDase activity, both in ATP and ADP hydrolysis. These results suggest an increase in ATP concentration as a consequence of a self-protection mechanism, and ADP, favoring thromboembolic changes. However, a significant increase in E-5'-NT activity has been observed, which, together with the reduction of ADA activity in both platelets and serum, leads to an increase in the extracellular concentration of adenosine, which may be involved in the tumor progression. Analyzing the oxidative profile, we observed a significant increase in the levels of ROS, which, together with the absence of a concomitant increase in antioxidant defenses represented by T-SHs and GSH levels, generate a pro-oxidant environment that justifies the elevated levels of thiobarbituric acid reactives substances (TBARS). The significant increase in BChE activity may be related to the stage of tumor progression, since patients in the study had pronounced nodules indicating a more advanced stage of cancer. The results demonstrated that, during the progression of thyroid cancer, alterations occur both in the activity of the enzymes of the purinergic and cholinergic systems as well as in the oxidative profile of these patients. Therefore, such parameters may represent future targets for the therapy and monitoring of the evolution of this neoplasm.

**Key words:** Thyroid Cancer. Purinergic System. Oxidative stress. Butyrylcholinesterase

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Representação esquemática da origem e progressão dos carcinomas tireoidianos .	21
Figura 2 - Esquema da arquitetura geral dos receptores P1 e P2 .....	29
Figura 3 - Componentes da sinalização purinérgica.....	32
Figura 4 - Representação de uma célula plaquetária .....	35
Figura 5 - Dano oxidativo às macromoléculas biológicas.....	37
Figura 6 - Mecanismo antioxidante enzimático.....	39

### MANUSCRITO I

**Fig. 1** E-NTPDase activity in the hydrolysis of ATP (A) and ADP (B) in platelets of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. \*\* P and \*\*\* P <0.05, n = 18-25 (A) and n = 17-25 (B). Activity of E-5`-NT (C) in platelets of patients with thyroid cancer and control group. \* P <0.05, n = 14-19. Specific enzymatic activities were reported as nmol of released Pi/min/mg protein. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.....66

**Fig. 2** E-ADA activity in platelets (A) and serum (B) of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. \* P <0.05, n = 19-19 (A) and n = 15-12 (B). Enzyme activities were reported as U ADA/mg protein and U/L, respectively. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.....67

**Fig. 3** ERO levels (A) in serum of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. \* P <0.05, n = 14-10. The results were expressed as DCFH-DA fluorescence. Levels of TBARS (B) in the serum of patients with thyroid cancer and control group. \* P <0.05, n = 10-11. Serum TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein. Levels of carbonylated proteins (C) in the serum of patients with thyroid cancer and control group. n = 13-10. The results were expressed as nmol carbonyl/mg total protein. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.....68

**Fig. 4** Levels T-SHs (A) and GSH (B) in the serum of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. n = 12-9 and n = 13-12, respectively. The thiol group content in the samples was expressed as nmol of T-SH/mg protein and that of GSH as nmol of GSH/ml of serum. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.....69

**Fig. 5** BChE activity in the serum of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. \* P <0.05, n = 14-10. The enzymatic activity was expressed in  $\mu$ mol of BcSCh/h/mg of protein. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.....70

MANUSCRITO II

**Fig. 1** Schematic representation of the origin and progression of thyroid carcinomas.....94

**Fig. 2** Enzymatic cascade: the conversion of ATP to adenosine.....95

**Fig. 3** Immunosuppression induced by the conversion of ATP to adenosine in tumor cells and immunosuppressive cells subsets.....96

## LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

**Table 1** - General characteristics of patients with Thyroid Cancer and Controls..... 64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
BChE	Butirilcolinesterase
CAT	Câncer Anaplásico de Tireoide
CAT	Catalase
CD	Cluster de Diferenciação
CDT	Câncer Diferenciado de Tireoide
CFT	Câncer Folicular de Tireoide
CMT	Câncer Medular de Tireoide
CPT	Câncer Papilar de Tireoide
DAIT	Doenças Autoimunes Tireoidianas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E-ADA	Ecto-adenosina Desaminase
E-NPP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase	Ectonucleosídeo trifosfato 5`-difosfohidrolase
E-5`-NT	Ecto-5`-nucleotidase
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IL1	Interleucina-1
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MDA	Malondialdeído
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Reduzido
PAF	Fator de Ativação Plaquetário
PAAF	Punção Aspirativa com Agulha Fina
PH	Potencial Hidrogênico

PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TSH	Hormônio Tiroestimulante
T-SHs	Tióis Totais
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
vWF	Fator von Willebrand

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
2.1 CÂNCER DE TIREOIDE .....	19
2.1.1 Tipos de câncer de tireoide .....	21
2.1.2 Carcinogênese .....	23
2.1.3 Diagnóstico .....	25
2.2 SISTEMA PURINÉRGICO .....	26
2.2.1 Nucleotídeos e nucleosídeo de adenina .....	26
2.2.2 Receptores purinérgicos.....	28
2.2.3 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina.....	29
2.3 PLAQUETAS .....	32
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
2.4.1 Indicadores de dano oxidativo.....	36
2.4.1.1 Peroxidação lipídica.....	36
2.4.1.2 Oxidação de proteínas.....	36
2.4.2 Defesas Antioxidantes.....	37
2.4.2.1 Antioxidantes enzimáticos.....	38
2.4.2.2 Antioxidantes não-enzimáticos.....	39
2.5 ENZIMAS QUE DEGRADAM ÉSTERES DE COLINA.....	40
2.5.1 Acetilcolina (ACh).....	40
2.5.2 Colinesterases.....	41
2.5.2.1 Acetilcolinesterase (AChE).....	41
2.5.2.2 Butirilcolinesterase (BChE).....	42
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>4 MANUSCRITOS</b> .....	<b>44</b>
4.1. Manuscrito I.....	45
4.2. Manuscrito II.....	71
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>97</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>103</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>105</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>118</b>
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	118
<b>ANEXOS</b> .....	<b>120</b>
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....	120
ANEXO B - CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II .....	124



## APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada da seguinte forma: primeiramente, são apresentadas a **INTRODUÇÃO**, a **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e os **OBJETIVOS**. A seguir, os resultados são apresentados na forma de dois manuscritos, os quais foram escritos de acordo com as normas dos periódicos aos quais foram ou irão ser submetidos. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO** dispostos após os dois manuscritos, contêm interpretações e comentários gerais referentes aos dois manuscritos. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** apresentadas no final da tese referem-se às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO**.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é uma doença maligna endócrina comum que aumentou rapidamente em incidência global nas últimas décadas (XING, 2005). Embora a taxa de mortalidade do câncer de tireoide seja relativamente baixa, a taxa de recorrência ou persistência da doença é alta, o que está associado ao aumento da incurabilidade e da morbidade e mortalidade dos pacientes (TUTTLE et al, 2010). É mais prevalente em mulheres, com idade acima de 45 anos, que em homens. A razão para esta diferença é desconhecida, mas acredita-se que os estrógenos possam aumentar direta ou indiretamente os níveis séricos de hormônio tireoestimulante (TSH) (ITO et al., 2013).

Os tumores da tireoide apresentam-se, tipicamente, como um nódulo tireoidiano unilateral indolor em um paciente que não apresenta alterações na produção dos hormônios tireoidianos. Esse nódulo pode ter sido notado pelo paciente ou apanhado como um achado incidental no ultrassom do pescoço. A prevalência relatada de nódulos tireoidianos varia com o método de triagem (NIX et al., 2005).

Existem vários tipos e subtipos histológicos de câncer de tireoide com diferentes origens celulares, características e prognósticos (DELELLIS et al., 2004). Existem dois tipos de células endócrinas da tireoide - células tireoideanas foliculares e células parafoliculares C - das quais são derivados os tipos de câncer de tireoide. Os tumores foliculares derivados de células tireoidianas, incluindo câncer papilar de tireoide (CPT), câncer folicular de tireoide (CFT) e câncer anaplásico de tireoide (CAT), representam a maioria das neoplasias malignas da tireoide. CPT e CFT são coletivamente classificados como câncer diferenciado de tireoide (CDT). O câncer medular de tireoide (CMT) derivado de células parafoliculares C é responsável por uma pequena proporção de malignidades da tireoide (HOWLADER et al., 2009). A citologia realizada a partir de punção aspirativa com agulha fina (PAAF) é a investigação diagnóstica de escolha na maioria dos casos de nódulos da tireoide (WILSON, 2002).

Os distúrbios da tireoide são caracterizados não só por alterações genéticas, mas também por respostas inflamatórias produzidas pelo dano ou necrose celular. O sistema purinérgico, o qual é constituído por enzimas, nucleotídeos, nucleosídeos de adenina e receptores purinérgicos, participa de muitas respostas celulares diferentes, entre as quais estão a estimulação (ou inibição) da morte celular, a proliferação, a migração, a diferenciação, a secreção de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (FRANCO et al., 2007; BOURS et al., 2011; ANTONIOLI et al., 2013; IDZKO et al. 2014). Processos fisiopatológicos

fundamentais, como a homeostase dos tecidos, neurodegeneração, imunidade, inflamação e câncer, são modulados por sinalização purinérgica (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

Cada nucleotídeo, uma vez presente no meio extracelular, desempenha sua ação biológica através de receptores específicos, denominados receptores purinérgicos P2 (DI VIRGILIO et al., 2001; KUNAPULI et al., 2003), que são divididos em duas famílias estruturalmente distintas: os receptores acoplados à proteína G, chamados de P2Y e os ligados a canais iônicos, designados P2X. A adenosina, por sua vez, se liga a receptores purinérgicos acoplados à proteína G do tipo P1 (BURNSTOCK, 2007). Dentre os diferentes receptores, destaca-se o receptor P2X7, o qual ativa a apoptose por facilitar a embriogênese e remover células cancerígenas ou células infectadas dos tecidos (DI VIRGILLIO et al., 1999).

A conversão de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina é uma característica crucial da sinalização purinérgica em condições fisiológicas e patológicas. As duas principais ectonucleotidases envolvidas, ectonucleosídeo trifosfato 5'-difosfohidrolase (E-NTPDase/CD39) e E-5'-nucleotidase (E-5'-NT/CD73), são moduladores chave da composição bioquímica do microambiente tumoral (YOUNG et al., 2014). Atualmente, entende-se que o principal mecanismo pelo qual E-NTPDase e E-5'-NT afetam o crescimento tumoral depende da sua capacidade de produzir adenosina (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017). A enzima E-adenosina desaminase (E-ADA) catalisa a desaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina, respectivamente (ROBSON et al., 2006).

Um elevado estresse oxidativo foi encontrado em muitos tipos diferentes de células cancerígenas e a introdução de antioxidantes pode inibir a proliferação de células tumorais, o que indica que as espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um importante papel na mediação da perda do controle do crescimento (BEHREND et al., 2003). O estresse oxidativo tem sido entendido como a produção de uma quantidade excessiva de EROs, sendo o resultado de um desequilíbrio entre a geração e a inativação dessas EROs (POLJSAK et al., 2013).

Altos níveis de EROs podem contribuir para a carcinogênese e a sinalização mediada por elas pode promover a sobrevivência, proliferação e metástase de células tumorais (WU, 2006). As EROs podem interagir com macromoléculas celulares como DNA, proteínas e lipídios e interferir nas funções celulares vitais. O principal alvo da peroxidação por EROs são os ácidos graxos poli-insaturados nos lipídios da membrana, levando à formação de peróxidos lipídicos como o malondialdeído (MDA) (SAMIR; KHOLY, 1999) O próprio MDA, devido à sua alta citotoxicidade e ação inibitória sobre as enzimas protetoras, é sugerido como um promotor tumoral e um agente carcinogênico (SEVEN et al., 1999).

Existem muitas evidências que demonstram o envolvimento de colinesterases em funções não clássicas (STEPHENSON et al., 1996; DARVESH et al., 2003) como a proliferação celular e diferenciação (LAYER; WILLBOLD, 1995), sugerindo uma possível influência das colinesterases na tumorigênese. A acetilcolinesterase (AChE) pode ser considerada um marcador precoce de diferenciação (LAYER; SPORNS, 1987), enquanto a butirilcolinesterase (BChE) pode estar envolvida no processo de migração celular (LAYER et al., 1988).

Diversas alternativas terapêuticas já foram empregadas em pacientes com câncer de tireoide progressivo, porém, a quimioterapia convencional não é efetiva na maior parte dos casos (WARD; ASSUMPÇÃO, 2004). Os carcinomas da tireoide são muito resistentes a agentes quimioterápicos (MALAGUARNERA et al., 2007). É evidente a necessidade de uma melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos na progressão do câncer de tireoide, visando à identificação de novos alvos terapêuticos com consequente melhoria do prognóstico de pacientes com carcinomas de tireoide de alto risco.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER DE TIREOIDE

As doenças da tireoide manifestam-se através da disfunção hormonal, seja por excesso ou por deficiência de produção de hormônios, ou por alterações anatômicas decorrentes do crescimento difuso ou nodular da glândula (BUFALO, 2007). A doença nodular tireoidiana é um problema clínico comum, que inclui um grande número de tireoidopatias, especialmente aquelas relacionadas à carência de iodo, tais como o bócio colóide, e às neoplasias (LIMA et al., 2007). Algumas das funções mais importantes dos hormônios da tireoide são: desenvolvimento inicial do cérebro, crescimento somático, maturação óssea, e síntese de RNAm de mais de 100 proteínas que regulam diferentes funções corporais (SARANAC et al., 2011).

As doenças autoimunes tireoidianas (DAIT) afetam de 2 a 5% da população geral, em especial mulheres adultas e idosas. Este grupo de doenças tireoidianas é determinado pela presença de infiltrado linfocítico de intensidade variável e produção de auto anticorpos tireoidianos dirigidos a antígenos específicos, podendo variar do hiper ao hipotireoidismo. A exata etiologia das DAIT permanece desconhecida, mas a interação entre susceptibilidade genética e fatores ambientais parece ser de fundamental importância no seu desenvolvimento (SGARBI; MACIEL, 2009).

O câncer da tireoide é o tumor maligno endócrino mais comum, cuja incidência vem aumentando nos últimos anos, devido principalmente a melhorias no diagnóstico e na compreensão das vias de sinalização molecular (ITO et al., 2013; ROSÁRIO et al., 2013; WU, 2013). Apesar da mortalidade por câncer de tireoide ser relativamente baixa, a taxa de recidiva ou persistência da doença é elevada, o que está associado com uma maior incurabilidade, morbidade e mortalidade dos pacientes (TUTTLE et al., 2010).

O câncer de tireoide é de três a cinco vezes mais frequente em mulheres do que em homens, e o aumento percentual anual da incidência é geralmente maior em mulheres (KILFOY et al., 2009). A razão para esta diferença é desconhecida, mas a alta prevalência de doenças da tireoide em mulheres e uma diminuição nas diferenças sexuais após o início da menopausa sugerem um papel primário dos estrogênios, tanto direta como indiretamente, através do aumento dos níveis séricos de TSH (ITO et al., 2013). A maior predileção da ocorrência do câncer de tireoide em mulheres e sua associação com fatores reprodutivos, ou estrogênios, ou ambos, foi proposta pelo menos em alguns estudos (NEGRI et al., 1999). Portanto, a exposição

a estrogênios exógenos de várias fontes, como contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e consumo de carne de animais tratados com hormônios esteroides sexuais para promoção do crescimento pode influenciar a taxa de câncer de tireoide. Finalmente, a função da glândula tireoide é sensível à baixa ingestão de iodo e a alguns poluentes ambientais, o que pode afetar o nível de TSH, um fator de crescimento para as células da tireoide (LEUNG et al., 2010).

Desde o início dos anos 80, a incidência de câncer de tireoide tem aumentado em todas as partes do mundo onde a assistência médica melhorou. O único continente onde a incidência não está aumentando é a África, possivelmente devido à insuficiente triagem de pacientes. No entanto, tanto a taxa de incidência como o aumento da incidência de câncer de tireoide variam de país para país (DAVIES; WELCH, 2006; COLONNA et al., 2007; KILFOY et al., 2009). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa de novos casos de câncer de tireoide para cada ano do biênio 2018-2019 é de 1.570 casos novos no sexo masculino e 8.040 no feminino, com um risco estimado de 1,49 casos para cada 100.000 homens e 7,57 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2018).

A variação percentual anual varia de 2% a 14% em mulheres e de 2% a 8% em indivíduos do sexo masculino (KILFOY et al., 2009). O aumento da incidência diz respeito a todos os tamanhos de tumores, mas é muito mais pronunciado para pequenos tumores (<2 cm de diâmetro) do que para tumores grandes (HARACH et al., 1985; COOPER et al., 2009). A maioria dos carcinomas pequenos não progride com o tempo e pode permanecer indetectável se eles não forem rastreados. Em um estudo do Japão, apenas 6,4% dos microcarcinomas que não foram removidos cirurgicamente apresentaram aumento de tamanho em 3 mm em 5 anos (ITO et al., 2010).

Embora o câncer seja relativamente raro, nódulos da tireoide são um problema de saúde pública. Estima-se que 10% da população venham a desenvolver um nódulo palpável durante a vida (TOMIMORI et al., 1995; FURLANETTO et al., 2000; SCHLUMBERGER; TORLANTANO, 2000; WELKER; ORLOV, 2003). O encontro incidental de nódulos ao exame ultrassonográfico, à cirurgia de doenças benignas da tireoide e em necropsias de indivíduos que nunca tiveram diagnóstico de doença tireoidiana em vida sugere que sua prevalência possa atingir níveis ainda mais elevados, especialmente entre indivíduos do sexo feminino e de maior idade (SCHLUMBERGER; TORLANTANO, 2000; BOONE et al., 2003; CHOW et al., 2003; WELKER; ORLOV, 2003). É provável que grande parte dos nódulos pequenos, eventualmente demonstrados por ultrassonografia ou exames de imagem mais sofisticados, nunca evoluam clinicamente, pois microcarcinomas podem ser encontrados em

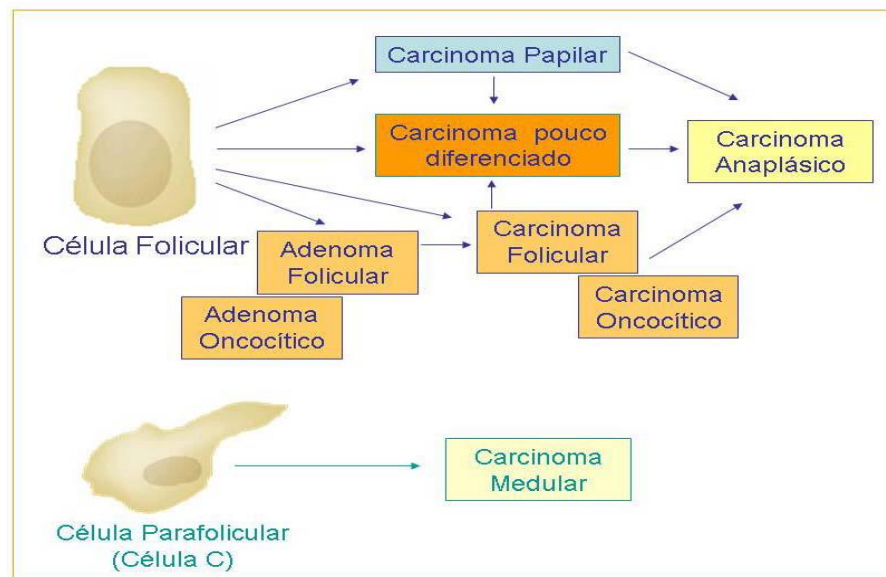
até 36% das autópsias realizadas em adultos mortos por outras causas que não câncer de tireoide (YAMAMOTO et al., 1990; CHOW et al., 2003).

Muitas doenças complexas são determinadas por três fatores principais: o estilo de vida, a exposição ambiental e a susceptibilidade genética. Estudos epidemiológicos estimam que cerca de 90% dos cânceres estejam relacionados a fatores ambientais (GUEMBAROVSKI, 2007).

### 2.1.1 Tipos de câncer de tireoide

As neoplasias da tireoide são classificadas de acordo com o tipo histológico em adenoma folicular, carcinoma papilar, carcinoma folicular e carcinoma anaplásico ou indiferenciado (Figura 1) (DELELLIS et al., 2004; DI CRISTOFARO et al., 2006). A maioria dos tumores tireoidianos, com exceção do carcinoma medular, deriva da célula folicular, que origina neoplasias benignas e malignas com diferentes características fenotípicas, biológicas e clínicas (DELELLIS et al., 2004).

Figura 1 – Representação esquemática da origem e progressão dos carcinomas tireoidianos.



Fonte: Adaptado de REIS (2010).

Os carcinomas papilar (CPT) e folicular (CFT) são considerados carcinomas diferenciados (CDT), uma vez que mantêm uma semelhança estrutural e funcional com o tecido tireoidiano normal e são responsáveis por pelo menos 94% dos carcinomas de tireoide

(COOPER et al., 2006; KENT et al., 2007). O carcinoma medular de tireoide (CMT), tumor neuroendócrino originário das células parafoliculares, corresponde a 3% dos casos, e o carcinoma anaplásico (CAT) ou indiferenciado, que deriva da indiferenciação dos CDT é responsável por aproximadamente 1% dos carcinomas da tireoide (DELELLIS et al., 2004; COOPER et al., 2006). O comportamento biológico desses tumores é muito variado, compreendendo formas de baixo potencial letal até formas extremamente agressivas e de alta mortalidade (GOLBERT et al., 2005).

O CDT quando precocemente diagnosticado é um tumor geralmente curável. O tratamento considerado mais adequado é a tireoidectomia total seguida de ablação actínica com  $I^{131}$ , que oferece ao paciente um prognóstico muito bom, com sobrevida longa (COOPER et al., 2006). Após a cirurgia e a radioterapia, os pacientes são tratados com levotiroxina, visando reduzir os níveis séricos de hormônio estimulante da tireoide (TSH) para minimizar o crescimento de qualquer tumor residual (WARD, 2005).

O CAT é considerado incurável por ocasião de sua apresentação. Deve-se tentar a tireoidectomia total com a retirada do tumor em bloco e dissecação do pescoço para a remoção total da massa. A quimioterapia utiliza uma série de drogas, mas nenhuma se revelou completamente eficaz (GOLBERT et al., 2005).

O tratamento apropriado para o CMT é a tireoidectomia total. A retirada de todo o tecido tireoidiano deve ser meticulosa, sem lesar as paratireoides. Além disso, recomenda-se a dissecação profilática dos linfonodos da região do pescoço (REIS, 2010).

O prognóstico quase sempre é favorável, sendo melhor nos casos de CDT, em que os fatores de risco têm papel importante na conduta terapêutica. Por sua vez, os CAT têm um prognóstico ruim, pois são tumores agressivos e que sofrem metástase muito rapidamente, podendo invadir órgãos como os pulmões, ossos, cérebro, fígado, pele, rins e outros, sendo que a morte ocorre, frequentemente, pouco tempo após o diagnóstico. O prognóstico do CMT depende da extensão da doença, da presença ou ausência de linfonodos metastáticos e da totalidade da ressecção cirúrgica. A sobrevida de cinco anos varia de 40% a 95% (INCA, 2002).

Os CPT são responsáveis por mais de 80% de todos os carcinomas da tireoide e quase todos os microcarcinomas, que são clinicamente assintomáticos e não progridem com o tempo, são CPT (DAVIES; WELCH, 2006; COLONNA et al., 2007; KILFOY et al., 2009). Os CPT grandes são, muitas vezes, clinicamente silenciosos e a aparente maior incidência também pode estar relacionada a uma melhor detecção. O CFT minimamente invasivo é raro e só é



diagnosticado numa fase tardia quando a invasão vascular e capsular estão presentes (ITO et al., 2013).

Os CAT correspondem a cerca de 1,6-14% das neoplasias malignas da glândula tireoide, predominando ligeiramente em áreas de bócio endêmico (SERRALHEIRO et.al., 2012). No entanto, embora raros, os CAT constituem uma das neoplasias mais agressivas em humanos, possuindo uma alta letalidade e responsabilizando-se por 14-39% das mortes devidas a câncer da tireoide (FIGUEIREDO, 2012). Geralmente, pacientes com CAT apresentam sobrevida média de apenas quatro a sete meses (DAL PIZZOL et al., 2009). A morte, usualmente, é consequência do crescimento rápido e agressivo do tumor, com invasão de estruturas vitais do pescoço (INCA, 2002).

As células indiferenciadas perdem as funções específicas das células tireoidianas, conduzindo a um aumento da proliferação celular com um crescimento tumoral rápido. Verifica-se nessas células uma perda da expressão do transportador sódio/iodeto, com perda da capacidade de concentrar eficazmente o iodo, e também uma diminuição dos receptores de TSH, com um crescimento independente deste (XAVIER et al., 2014).

### **2.1.2 Carcinogênese**

Nos últimos anos, ocorreu um grande progresso na compreensão da patogênese molecular do câncer de tireoide, a qual é exemplificada pela elucidação de várias vias principais de sinalização e desordens moleculares relacionadas a essa neoplasia. O câncer de tireoide é considerado predominantemente uma doença genética, caracterizada por acúmulo sequencial de alterações genéticas (GOYAL et al., 2013; XING et al., 2013). Mutações a partir de exposições ambientais podem resultar em rupturas da cadeia de DNA, causando uma instabilidade genômica, a qual representa um evento molecular e patogênico crucial no processo de carcinogênese (ALT et al., 2013; PAPAMICHOS-CHRONAKIS; PETERSON, 2013).

A carcinogênese caracteriza-se por mutações genéticas herdadas ou adquiridas pela ação de agentes ambientais, químicos, hormonais, radioativos e virais, denominados carcinógenos (COTRAN et al., 2000). A carcinogênese compreende quatro estádios: a iniciação que se caracteriza pela exposição das células aos carcinógenos com consequente mutação e formação de clones celulares atípicos, e a promoção, que se caracteriza pela multiplicação desses clones celulares. Nessa fase, a supressão do contato com os carcinógenos pode interromper o processo (PERATONI, 1998). A progressão e a conversão maligna das células compõem, respectivamente, o terceiro e o quarto estádios da carcinogênese. Neles, as células

transformadas apresentam autonomia para proliferar e, pela perda da coesão e obtenção da mobilidade, tornam-se invasivas (COOPER, 1995; MAREEL; LEROY, 2003).

Os principais alvos da alteração genética são os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes que controlam a morte celular programada ou apoptose (DELFINO et al., 1997). Acredita-se que os genes reparadores do DNA também possuam papel de destaque na carcinogênese, pois qualquer anormalidade nesses genes predisporia a mutações no genoma com subsequente transformação neoplásica (COTRAN et al., 2000; LOURO, 2000).

Os proto-oncogenes são genes promotores do crescimento e da diferenciação celular que controlam a divisão mitótica ordenada das células (McKINNELL, 1998). Eles são transformados em oncogenes pelo descontrole da expressão dos genes ou pela mutação, translocação ou rearranjo dos genes, resultando na síntese de um produto anormal, as oncoproteínas (CARREÑO et al., 1999).

O gene p53 é um dos genes supressores tumorais que regulam a transcrição nuclear e o ciclo celular (DENG; BRODIE, 2001). É denominado guardião do genoma e produz uma proteína que controla a replicação do DNA, a proliferação celular e a apoptose. Nas células com DNA alterado, a proteína p53 acumula-se no núcleo e liga-se ao DNA evitando sua replicação. Essa parada no crescimento celular na fase G1 permite à célula restaurar seu genoma (COTRAN et al., 2000). Entretanto, danos irreversíveis requerem a eliminação das células acometidas (PINES, 1995). As mutações envolvendo o gene p53 são eventos genéticos frequentemente observados em vários tipos de câncer. Além das mutações nesse gene, o polimorfismo da proteína codificada por ele também é relatado como evento genético associado ao desenvolvimento do câncer (BOND; LEVINE, 2007).

O TSH é o principal regulador do crescimento e da função da tireoide. O excesso de TSH é fator predisponente para o câncer da tireoide (MEUTEN, 2002). A presença de receptores para o estrógeno nas células neoplásicas da tireoide e a maior frequência em mulheres sugere também a participação dos hormônios sexuais femininos na gênese dessa neoplasia (LUOTTO et al., 1997).

A hipótese de que alguns hormônios aumentam a incidência das neoplasias foi postulada pela primeira vez por BITTNER et al. (1948). Postula-se que na carcinogênese hormonal, diferente daquela induzida por vírus ou agentes químicos, a proliferação celular não necessita de um agente iniciador específico. Os hormônios induzem proliferação celular com consequentes mutações genéticas que darão origem à célula neoplásica (MEUTEN, 2002). No entanto, para CARREÑO et al. (1999), a participação dos hormônios na carcinogênese se restringe à proliferação das células já transformadas por outros carcinógenos. Os genes

específicos envolvidos na progressão das neoplasias hormônio-dependentes permanecem desconhecidos, contudo, acredita-se que os oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes do reparo do DNA estejam envolvidos na carcinogênese hormonal (HENDERSON; FEIGELSON, 2000).

### **2.1.3 Diagnóstico**

O desfecho dos pacientes com câncer de tireoide tem melhorado acentuadamente nas últimas duas décadas como consequência de um diagnóstico mais precoce e mais preciso, tanto da doença primária quanto da recorrente, e do desenvolvimento de tratamentos eficazes. O uso generalizado de procedimentos sensíveis de ultrassonografia, medições ultrasensíveis de tireoglobulina sérica e técnicas avançadas de imagem possibilitaram uma detecção mais precoce e melhoraram a precisão da localização do câncer. O aumento do uso da tireoidectomia total e da excisão dos linfonodos cervicais reduziu o risco de câncer residual ou recorrente. Na última década, os pacientes com câncer avançado e agressivo se beneficiaram de novas ferramentas diagnósticas e prognósticas, como a tomografia por emissão de pósitrons (PET), e de uma abordagem multiespecializada mais efetiva no tratamento de invasão local e metástases à distância. Além disso, o uso de inibidores de tirosina quinase contribuiu para um aumento da sobrevida global destes pacientes. Todas essas melhorias deveriam ter diminuído a mortalidade relacionada ao câncer, mas em contraste com muitos outros tipos de câncer, a mortalidade relacionada ao câncer de tireoide não diminuiu (ITO et al., 2013).

Não há dúvida de que a melhor estratégia diagnóstica de malignidade tireoidiana, em termos de custo-benefício, é a PAAF para exame citológico do material coletado, cuja técnica de punção é muito simples e rápida. A PAAF é capaz de estabelecer o diagnóstico de câncer de tireoide com 95% de acurácia na maior parte dos serviços. A punção pode ainda ser guiada por ultrassonografia, nos nódulos pequenos e não palpáveis, fato que diminuiu sensivelmente o número de amostras coletadas insatisfatórias ou insuficientes para adequado diagnóstico citológico e estabelecimento de conduta (WARD et al., 1993; GHARIB, 1994; DANESE et al., 1998; CASTRO; GHARIB, 2003; KIM et al., 2003).

Na prática, cerca de 70% das biópsias realizadas com agulha fina têm resultado de citologia benigna, 10% são suspeitas, 5% malignas e 15% não permitem diagnóstico com o material obtido. Estas últimas devem ser repetidas. Lesões puncionadas nas quais o diagnóstico não foi possível numa primeira punção, e, mais ainda, em uma segunda punção, devem ser cuidadosamente monitoradas. Entre as suspeitas, cerca de 20% serão malignas e, nestes casos,

voltamos a considerar o risco clínico e epidemiológico para cada indivíduo antes de propor nova punção, seguimento clínico, terapia cirúrgica ou supressão com levotiroxina (WARD et al., 1993; GHARIB, 1994; DANESE et al., 1998; RAVETTO et al., 2000; CASTRO; GHARIB, 2003; KIM et al., 2003; SLOWINNSKA-KLENCKA et al., 2004).

O uso frequente da ultrassonografia cervical e outras técnicas de imagem, de biópsia por aspiração com agulha fina e a cirurgia completa da tireoide por condições benignas com um exame histológico cuidadoso da glândula, levam à detecção de um número crescente de casos de câncer de tireoide (LEENHARDT et al., 2004).

## 2.2 SISTEMA PURINÉRGICO

Os distúrbios da tireoide são caracterizados não só por alterações genéticas, mas também por respostas inflamatórias produzidas pelo dano ou necrose celular. Durante o processo inflamatório, o sistema purinérgico, o qual é constituído por nucleotídeos, nucleosídeos, receptores purinérgicos e enzimas, apresenta uma relação intrínseca com a modulação dos diferentes padrões de resposta imune (FRANCO et al., 2007; DI VIRGILIO et al., 2009).

### 2.2.1 Nucleotídeos e Nucleosídeo de adenina

Nucleotídeos e nucleosídeos são importantes moléculas sinalizadoras envolvidas em muitos processos biológicos. Os nucleosídeos são formados por uma pentose e uma base púrica ou pirimídica. A fosforilação destes nucleosídeos, por quinases específicas, dá origem aos denominados nucleotídeos. Estas moléculas estão envolvidas na transmissão de informação genética, nos processos de transferência e armazenamento de energia e na sinalização celular (ATKINSON et al., 2006).

Os nucleotídeos da adenina adenosina tri, di e monofosfato (ATP, ADP e AMP, respectivamente) e seu derivado nucleosídeo adenosina, os quais são secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas, representam uma importante classe de moléculas extracelulares que desempenham um papel fundamental mediando diversos efeitos biológicos, incluindo a contração do músculo liso, a neurotransmissão, a agregação plaquetária, a modulação da função cardíaca, a dor, a resposta imune e a inflamação (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Entretanto, encontram-se nos fluidos extracelulares em concentrações micromolares devido a vários mecanismos como: lise celular, permeabilidade seletiva da

membrana plasmática e exocitose de vesículas secretoras como os corpos densos plaquetários (ENJYOJI et al., 1999).

O ATP, ADP e AMP e a adenosina são considerados importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos (YEGUTKIN, 2008). O ATP é uma molécula com atividade pró-inflamatória sendo essencial nas funções desempenhadas por linfócitos, mas, em elevadas concentrações, o ATP pode atuar como uma potente molécula citotóxica, capaz de levar à morte diferentes classes de células, pela formação de grandes poros na membrana plasmática, com exceção daquelas que possuem alto poder de quebra do ATP em sua superfície (FILIPPINI et al., 1990). Foi observada uma alta concentração de ATP no local da inflamação, como consequência de sua liberação ativa ou passiva de mastócitos, linfócitos, macrófagos, células endoteliais e necróticas (DI VIRGILIO, 2007; SCHETINGER et al., 2007).

O ADP, no meio extracelular, atua como um mediador primário da ativação plaquetária, contribuindo para a homeostasia e formação de trombos, através do seu efeito agregatório após danos teciduais (BOROWIEC et al., 2006). Em situações de disfunção ou dano vascular, o ADP é liberado do interior de grânulos existentes nas plaquetas, sendo então considerado o agonista mais importante do recrutamento plaquetário e o indutor da formação de trombos no interior de vasos (MARCUS et al., 2003). O ATP é considerado um inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP, embora evidências indiquem a existência de mecanismos não competitivos e demonstrem que o ATP, em altas ou baixas concentrações, modula diferentemente a agregação plaquetária (SOSLAU; YOUNGPRAPAKORN, 1997; BIRK et al., 2002; REMIJIN et al., 2002).

O AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP (BARSOTTI; IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo, servindo também como substrato para a formação da adenosina (CUNHA, 2001).

A degradação de nucleotídeos na presença de uma cascata de ecto-nucleotidases, que inclui E-NTPDase e E-5'-NT, leva à geração de adenosina extracelular (OHTA, 2001; OHTA, 2006; RABINOVICH, 2007). A adenosina, que atua através de receptores acoplados à proteína G, é conhecida por exercer uma multiplicidade de efeitos fisiológicos, os quais são cardioprotetores e neuroprotetores, incluindo vasodilatação, estimulação da angiogênese, citoproteção e imunossupressão (OHTA, 2006). Várias dessas atividades, incluindo vasodilatação, angiogênese e promoção do crescimento, têm sido relatadas no contexto do câncer (LINDEN, 2001; SITKOVSKY, 2004; COLGAN, 2006; SITKOVSKY, 2008). Além disso, as atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras da adenosina também podem inibir a supressão, imunologicamente mediada, do crescimento tumoral. Assim, a adenosina pode ser

um metabólito importante liberado por células cancerígenas que suscita respostas fisiológicas que promovem a progressão tumoral (ZHANG, 2010).

### **2.2.2 Receptores purinérgicos**

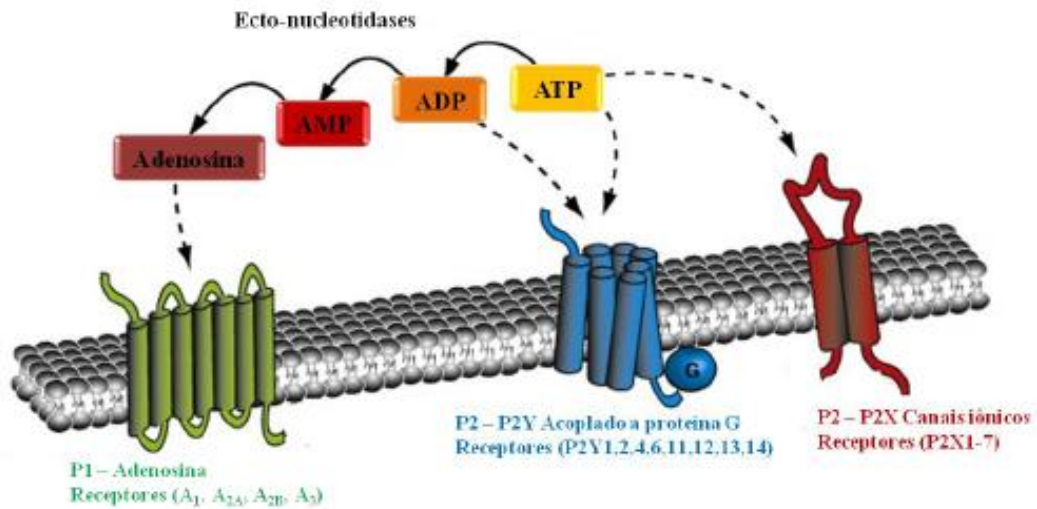
Em condições fisiológicas, os nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina são encontrados no meio extracelular em baixas concentrações, não atravessando a membrana celular, mas podendo realizar suas ações biológicas através de receptores específicos presentes na superfície celular, denominados receptores purinérgicos (DI VIRGILIO et al., 2001).

Os elementos mais amplamente estudados dos sistemas de sinalização purinérgica são os receptores purinérgicos, os quais estão divididos em duas famílias principais, P1 e P2, com base nas suas propriedades farmacológicas e estruturais. Esses receptores estão presentes na superfície de diversas células, cujos membros são ativados pela adenosina e por ATP e ADP, respectivamente (Figura 2) (BURNSTOCK, 2007; JUNGER, 2011).

Os receptores P1 de adenosina estão acoplados à proteína G e possuem sete domínios de proteína transmembrana, sendo reconhecidos quatro tipos de receptores (A1, A2A, A2B e A3). A subclassificação dos receptores de adenosina baseia-se nos efeitos que causam sobre a mudança da concentração de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) na célula e sua afinidade pelo ligante. A adenosina é seu único agonista endógeno, no entanto, o receptor A3 pode ser ativado também pela inosina (BOROWIEC, 2006).

Os receptores P2 estão divididos em duas subfamílias: receptores acoplados à proteína G (P2Y) e ligados a canais iônicos (P2X) (ZIMMERMANN, 2000). Em células de mamíferos, cinco receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11) e sete receptores P2X (P2X1-7) foram clonados e caracterizados farmacologicamente (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os receptores P2X funcionam como canais iônicos de ATP que facilitam o influxo de cátions extracelulares, incluindo íons cálcio. Entre os receptores P2X, o subtipo P2X7 exerce um papel especial, uma vez que as concentrações micromolares de ATP desencadeiam a função de canal iônico, enquanto que concentrações maiores de ATP (na faixa milimolar) induzem P2X7 a formar grandes poros de condutância envolvidos na apoptose (JARVIS; KHAKH, 2009). Os receptores P2Y reconhecem ATP e vários outros nucleotídeos, incluindo ADP, UTP, UDP e UDP-glicose (JUNGER, 2011).

Figura 2 – Esquema da arquitetura geral dos receptores P1 e P2.



Fonte: Adaptado de GUAN et al. (2007).

### 2.2.3 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina

As moléculas de nucleotídeos, após desempenhar suas funções orgânicas, devem ser degradadas de modo a manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas. Para isto, existe um conjunto de enzimas ancoradas na membrana plasmática das células, responsável pelo controle dos seus níveis extracelulares. Tais enzimas são conhecidas como ectonucleotidases e podem ser classificadas como E-NTPDase (ectonucleosídeo trifostato 5'-difosfohidrolase; EC 3.6.1.5; CD39), E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase; EC 3.1.4.1), fosfatases alcalinas e E-5'-NT (E-5'-nucleotidase; EC 3.1.3.5; CD73) sendo amplamente distribuídas nos tecidos (ZIMMERMANN, 2000).

Estas enzimas atuam formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP, formando AMP. A seguir a enzima E-5'-NT hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001). Ainda, seguindo a sequência de degradação dos nucleotídeos, existe a enzima E-ADA (adenosina desaminase; EC 3.5.4.4), a qual regula as concentrações de adenosina, através da formação de inosina (Figura 3) (ZIMMERMANN, 2000; BOURS et al., 2006).

Além de possuírem importante atividade na regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina, as ectoenzimas possuem ações extremamente importantes no sistema

imunológico (SALAZAR-GONZALEZ et al., 1985). A E-NTPDase é conhecida como um marcador de superfície celular (CD39) estando presente em linfócitos, plaquetas e células do endotélio vascular onde desempenha controle da função dos linfócitos, incluindo o reconhecimento de antígenos e ativação de funções efetoras das células T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990), além da capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (MALISZEWSKI et al., 1994; KACZMAREK et al., 1996). Por sua vez, a enzima E-5'-NT é um marcador de superfície celular (CD73), indicativo de maturação de linfócitos (THOMPSON et al., 1986), e a adenosina desaminase, tornou-se conhecida como um marcador molecular de ativação de células T (FRANCO et al., 2007).

As E-NTPDases são um grupo de enzimas extracelulares glicosiladas que hidrolisam ATP e ADP para AMP (ZIMMERMANN et al., 2001a). Estas enzimas requerem concentrações milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  para exercerem atividade e tem sido bem caracterizadas no sistema nervoso central (SNC) e em outros tecidos, como em plaquetas e em linfócitos (PILLA et al., 1996; SCHETINGER et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; LUNKES et al., 2004; LEAL et al., 2005).

Até o momento, oito diferentes membros da família das E-NTPDases foram descritos, clonados e estudados (NTPDase 1-8). As NTPDases 1,2,3 e 8 são enzimas localizadas na superfície celular, com sítio catalítico localizado extracelularmente. Nas NTPDases 4, 5, 6 e 7, o sítio catalítico parece estar localizado intracelularmente (ROBSON et al., 2006). Estas ectoenzimas estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos e patológicos em diversos tecidos.

A NTPDase-1 (CD39), a qual hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP, foi a primeira enzima da família das NTPDases a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembrana próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN 2001). A NTPDase-1 de plaquetas intactas de humanos pode estar envolvida na regulação da concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular (ENJYOJI, 1999).

Alguns estudos indicam que o uso de CD39 solúvel constitui-se em um potencial agente terapêutico para inibição de processos trombóticos mediados por plaquetas. A solução purificada de CD39 bloqueou *in vitro* a agregação plaquetária induzida por ADP e inibiu a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (GAYLE et al., 1998; ENJYOJI et al., 1999).

A família das E-NPPs é constituída por sete enzimas estruturalmente relacionadas (NPP1-NPP7), as quais são numeradas conforme a ordem de caracterização. Os membros desta família multigênica possuem uma ampla especificidade de substratos e são capazes de hidrolisar



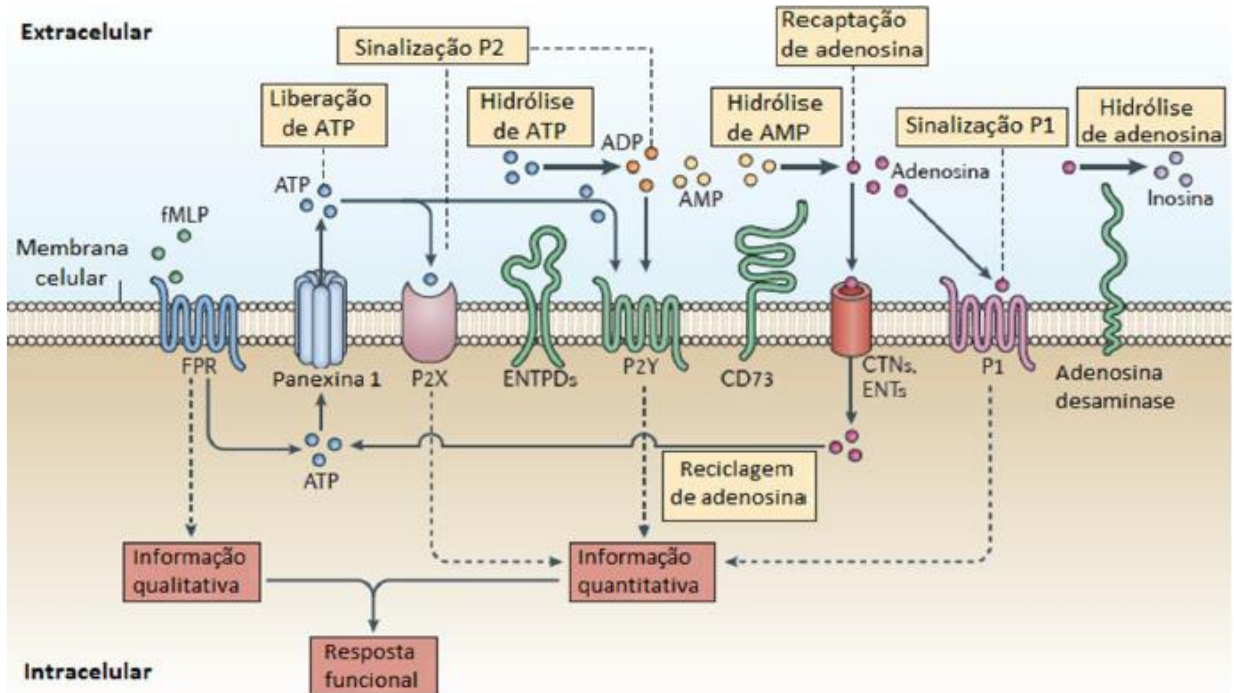
ligações pirofosfato e fosfodiéster em nucleotídeos, ácidos nucleicos e nucleotídeos açúcares (YEGUTKIN, 2008). Entretanto, somente as NPPs 1-3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos, sendo relevantes na regulação da cascata de sinalização purinérgica. Evidências sugerem que as NPPs apresentam vastos papéis fisiológicos, incluindo reciclagem de nucleotídeos, modulação da sinalização purinérgica, regulação dos níveis de pirofosfato extracelular, proliferação e motilidade celular (STEFAN et al., 2006)

A E-5'-NT é uma glicoproteína ligada à membrana via um glicosil fosfatidil inositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, que catalisa a hidrólise éster fosfórica do 5'-ribonucleotídeo para o correspondente nucleosídeo e fosfato. Geralmente, o nucleotídeo mais susceptível a hidrólise é o AMP, o qual formará a adenosina (ZIMMERMANN, 2001). A E-5'-NT encontra-se amplamente distribuída em uma variedade de tecidos como rins, fígado, pulmões, endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune (COLGAN et al., 2006). As funções da E-5'-NT correlacionam-se diretamente com o seu papel na produção de adenosina. Assim, de acordo com a sua localização tecidual, ela desempenha importantes funções como, por exemplo, no controle da agregação plaquetária, na regulação do tônus vascular e também na neuromodulação e neuroproteção no sistema nervoso (ZIMMERMANN et al., 1998; KAWASHIMA et al., 2000).

A E-ADA é uma importante enzima da cadeia de inativação de purinas, que catalisa a desaminação irreversível de adenosina e 2'-deoxiadenosina para inosina e 2'-deoxiinosina, respectivamente. Sendo assim, é responsável por regular as concentrações extracelulares de adenosina (YEGUTKIN, 2008). A E-ADA é amplamente distribuída nos tecidos dos animais vertebrados e divide-se em duas isoformas: ADA1 e ADA2. Os tecidos contêm predominantemente ADA1. Já a ADA2, é o principal componente do soro e é um suposto estimulador de células-T (BURNSTOCK, 2006).

Altos níveis dessa enzima são encontrados no sistema linfóide (linfonodos, baço e timo), podendo também ser encontrada, mas em menor quantidade, nos eritrócitos (CRISTALLI et al., 2001; SABOURY et al., 2003). Alguns estudos têm demonstrado que a ADA desempenha um papel importante na função dos linfócitos e é essencial para a diferenciação e a proliferação de linfócitos T (FRANCO et al., 1997).

Figura 3 – Componentes da sinalização purinérgica. As ectonucleotidases E-NTPDase e CD73 promovem a hidrólise de ATP e a formação de adenosina que ativa os receptores P1. A adenosina pode ser convertida à inosina pela enzima adenosina desaminase ou pode ser recaptada através de transportadores de nucleosídeos (ENTs).



Fonte: Adaptado de JUNGER (2011).

### 2.3 PLAQUETAS

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue e produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea (SCHULZE; SHIVDASANI, 2005; ITALIANO; HARTWIG, 2011; LEVIN, 2011). As plaquetas apresentam-se como células incompletas formadas apenas por porções do citoplasma das células que lhes dão origem, os megacariócitos (Figura 4) (LORENZI et al., 2003).

Têm a forma discóide ou elipsóide e nelas se reconhecem três zonas: (1) zona externa ou periférica, na qual se encontram antígenos, glicoproteínas e vários tipos de enzimas. Essa porção externa condiciona a propriedade de adesão que as plaquetas exibem após serem estimuladas. Mais internamente, existe a membrana plaquetária, a qual é formada, dentre outras substâncias, por proteínas. Essas proteínas são quase que em sua totalidade glicoproteínas, sendo que algumas têm função de receptores específicos para determinados fatores de

coagulação; (2) citosol, o qual contém microtúbulos que se conectam com microfilamentos, formando o esqueleto da plaqueta; (3) zona de organelas, onde são encontrados vários tipos de estrutura como corpos densos ( $\text{Ca}^{2+}$ , ADP, ATP, serotonina, pirofosfato), grânulos alfa (fatores de crescimento, fatores de coagulação e proteínas de adesão), lisossomas, mitocôndrias, glicogênio e um sistema de membranas internas, local de síntese de prostaglandina e tromboxano (LORENZI et al., 2003).

Sob condições fisiológicas, as plaquetas circulam no sangue com mínima interação com outras células ou com a parede do vaso. No entanto, essas células podem ser prontamente ativadas por inúmeros estímulos, incluindo o fluxo sanguíneo turbulento, bem como o colágeno exposto das paredes dos vasos lesionados (WEKSLER, 1992).

As plaquetas desempenham um papel essencial nas primeiras fases do processo hemostático (BLOCKMANS et al., 1995). A hemostasia pode ser considerada como um aspecto da resposta de defesa do hospedeiro à lesão na parede do vaso, na qual as plaquetas ativadas desempenham o papel principal na formação do tampão hemostático (hemostasia primária) (BAKKER et al., 1994). As plaquetas ativadas aderem à superfície subendotelial exposta através da glicoproteína Ib e do fator von Willebrand (vWF). Na fase posterior à ativação, as plaquetas se agregam umas às outras, dando origem à agregação plaquetária, a qual envolve o fibrinogênio e os íons  $\text{Ca}^{2+}$ . O fibrinogênio, o qual se encontra solúvel no plasma, liga-se aos receptores específicos da membrana plaquetária (GPIIb-IIIa), permitindo que as plaquetas permaneçam ligadas entre si (LORENZI et al., 2003). Essa agregação resulta na formação do tampão plaquetário (VANNI et al., 2007; AUSTIN, 2008).

A síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico das plaquetas se faz por alteração dos fosfolípidos da membrana após a ativação pelo colágeno. Como resultado, forma-se também o tromboxano  $\text{A}_2$ , que por sua vez, acelera a liberação de ADP. Esse ADP facilita a agregação de novas plaquetas (LORENZI et al., 2003).

Após o processo de adesão e agregação, a liberação de substâncias pré-formadas dos grânulos densos, isto é, serotonina, ADP e  $\text{Ca}^{2+}$ , leva a uma maior ativação e agregação de plaquetas. Concorrente com uma mudança de forma após a ativação plaquetária, a atividade pró-coagulante plaquetária, a qual requer influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana plasmática, contribui para o segundo passo da hemostasia. Assim, a ligação do fator X ao fator Va e  $\text{Ca}^{2+}$  resulta em um complexo de protrombinase ligado à membrana que promove a geração local de trombina. O nucleotídeo ADP, uma vez liberado após a estimulação plaquetária, é capaz de ativar outras plaquetas que, por sua vez, também liberam ADP e assim por diante. Nesse caminho, o ADP extracelular funciona como uma molécula de amplificação. O ATP mostrou

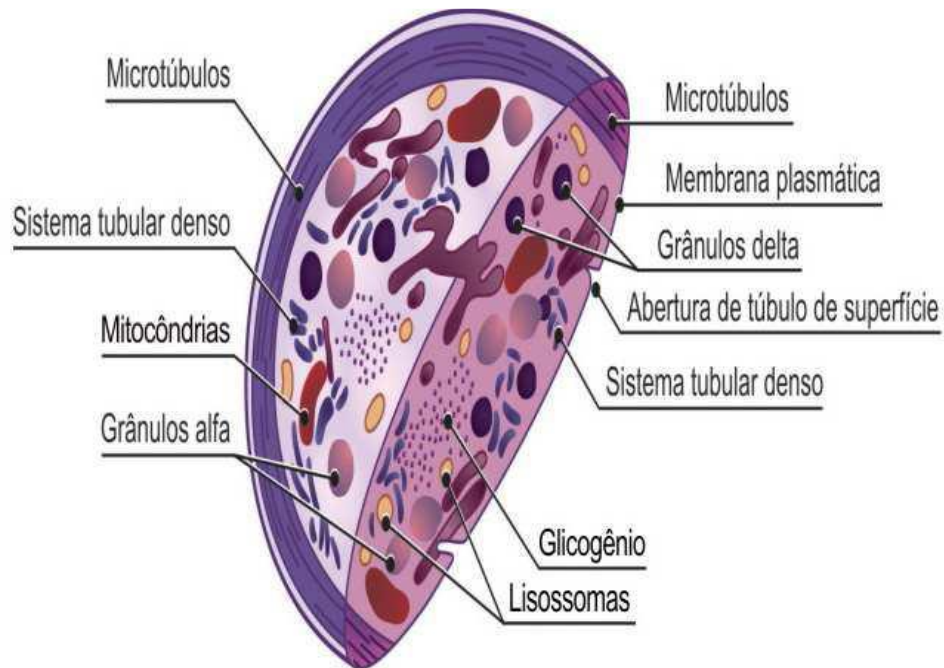
aumentar a resposta inflamatória de granulócitos através de receptores purinérgicos presentes nessas células (WARD et al., 1988; LINCOLN; BURNSTOCK, 1990).

Os nucleotídeos extracelulares de adenina, ATP e ADP, e adenosina são conhecidos por regular a resposta vascular à lesão endotelial. O ADP é o principal promotor da agregação plaquetária, enquanto que a adenosina é um potente inibidor. Verificou-se que altas concentrações de ATP inibem a agregação plaquetária induzida por ADP in vitro (SOSLAU et al., 1995; LEON et al., 1997; PARK; HOURANI, 1999). No entanto, demonstrou-se que baixas concentrações de ATP (0,01-1,0  $\mu\text{mol/L}$ ) podem aumentar significativamente o colágeno, o tromboxano A<sub>2</sub> e a agregação plaquetária induzida por trombina (SOSLAU; YOUNGPRAPAKORN, 1997; SOSLAU et al., 2000). Além disso, a ativação do receptor de ATP ligado ao canal de cálcio (P<sub>2</sub>X<sub>1</sub>) em plaquetas, estimula a mudança da forma plaquetária, sugerindo que o ATP contribui para a ativação plaquetária (ROLF et al., 2001; OURY et al., 2001). Esses achados sugerem um complexo papel do ATP na regulação da agregação plaquetária; a ação do ATP, provavelmente, é prejudicada pela sua hidrólise na circulação (BIRK et al., 2002).

Alguns estudos demonstraram que os distúrbios da tireoide são caracterizados não só por alterações genéticas, mas também por respostas inflamatórias produzidas pelo dano ou necrose celular (FRANCO et al., 2007; DI VIRGILIO et al., 2009). Embora o processo de hemostasia possa ser considerado como uma resposta fisiológica à lesão, sua contraparte patológica, isto é, a trombose, pode ocorrer em condições inflamatórias. Embora nessa condição as contagens de plaquetas sejam muitas vezes elevadas, foi demonstrado que o endotélio vascular alterado por citocinas inflamatórias, como interleucina-1 (IL1) e o fator de necrose tumoral (TNF), prepara o cenário para eventos protrombóticos (STERN et al., 1985; NAWROTH; STERN, 1986).

Assim, no microambiente inflamatório, a membrana das células endoteliais pode ativar as plaquetas. A membrana celular endotelial sofre alterações, iniciadas por citocinas, que resultam na ativação e ligação de fatores de coagulação, síntese do fator tecidual, ativação da trombina, produção do fator de ativação plaquetário (PAF) e liberação do inibidor do ativador de plasminogênio (STERN et al., 1985; BUSSOLINO et al., 1986).

Figura 4 – Representação de uma célula plaquetária.



Fonte: Adaptado de LORENZI et al. (2003).

## 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, particularmente, das EROs, e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies. Quando ocorre um favorecimento à produção de EROs e um quadro de estresse oxidativo instala-se, a transformação progressiva de células para a sua forma maligna ocorre mais facilmente, proporcionando um aumento na frequência de mutações devido aos danos no DNA e, conseqüentemente, um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias (ARDIES, 2003; COOK et al., 2004; GOTO et al., 2007).

As EROs são subprodutos do metabolismo aeróbio e incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e radicais hidroxila ( $OH^-$ ), os quais possuem propriedades químicas inerentes que conferem reatividade a diferentes alvos biológicos (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). As EROs podem interagir com macromoléculas celulares, como DNA, proteínas e lipídios, e interferir nas funções celulares vitais (Figura 5) (GUPTA et al., 2009). Altos níveis de EROs podem contribuir para a carcinogênese, e a sinalização mediada por elas

pode promover a sobrevivência, proliferação e metástase de células tumorais (MULLER; LIPP, 2001). Foi demonstrado que as células cancerígenas são caracterizadas por maiores níveis de EROs que as células saudáveis (YOUSRI et al., 2011).

## **2.4.1 Indicadores de dano oxidativo**

### **2.4.1.1 Peroxidação lipídica**

Níveis elevados de estresse oxidativo resultam em peroxidação de lipídios de membrana (GUPTA et al., 2009). As membranas celulares contêm ácidos graxos insaturados, muitos deles sendo poli-insaturados e, portanto, suscetíveis à oxidação pelas EROs (MARNETT, 2000).

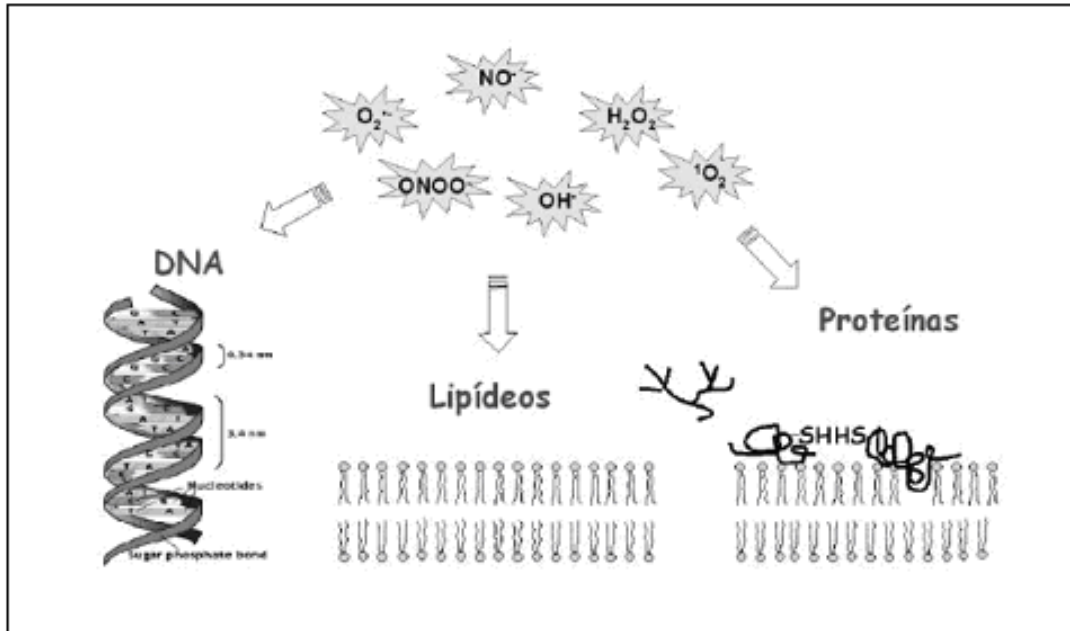
Ocorrem reações em cadeia das EROs na camada lipídica poli-insaturada, as quais resultam, além da peroxidação lipídica, em oxidação de proteínas, perda ou enfraquecimento da estrutura e função da membrana celular, e geração de produtos de aldeído como a acroleína, crotonaldeído, malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (KLAUNIG et al., 1998; MARNETT, 2000).

Os níveis plasmáticos de MDA refletem a extensão da peroxidação lipídica, portanto, servem como um marcador para danos mediados por radicais livres. Devido a sua alta citotoxicidade e ação inibitória sobre as enzimas protetoras, o MDA é sugerido como um promotor tumoral e um agente carcinogênico (SEVEN et al., 1999).

### **2.4.1.2 Oxidação de proteínas**

As proteínas são alvos imediatos para a modificação oxidativa ocasionada por EROs, alterando sua estrutura e provocando perda de função e fragmentação das estruturas proteicas (BEAL et al., 2003; DALLE-DONNE et al., 2003a). EROs podem danificar proteínas direta ou indiretamente, através do ataque de aldeídos reativos como o MDA, formado durante a peroxidação lipídica (GRIMSRUD et al., 2008). As consequências do dano proteico derivado de EROs incluem a modificação da atividade de enzima, danos aos transportadores de membrana, e interação com receptores, todos os quais são potencialmente devastadores para a fisiologia celular normal (KLAUNIG et al., 1998). A carbonilação proteica parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (DALL-DONNE et al., 2003b), pois trata-se de um marcador estável de oxidação proteica.

Figura 5 – Dano oxidativo às macromoléculas biológicas.



Fonte: Adaptado de TORRES (2003).

#### 2.4.2 Defesas Antioxidantes

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação nociva dos radicais livres ou das EROs (BARBOSA et al., 2010). Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, é qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração se comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Os primeiros tipos identificados de sistemas de defesa antioxidante desenvolvidos contra o dano oxidativo, são aqueles que impedem a ocorrência de EROs e aqueles que bloqueiam ou capturam radicais que são formados (CHEESEMAN; SLATER, 1993). Estes sistemas presentes nos compartimentos celulares aquosos e membranares podem ser enzimáticos e não enzimáticos (PISOSCHI; POP, 2015).

Estudos epidemiológicos comprovaram a capacidade dos antioxidantes em conter os efeitos da atividade de EROs e diminuir a incidência de câncer e outras doenças degenerativas. No entanto, principalmente na ação sustentada dos radicais livres, a capacidade do sistema de

defesa contra as EROs pode ser superada, levando à ocorrência de doenças (GODIC et al., 2014). Os sistemas de defesa antioxidante trabalham cooperativamente para aliviar o estresse oxidativo causado pela produção aumentada dos radicais livres. Qualquer mudança em um desses sistemas pode quebrar esse equilíbrio e causar dano celular e, em última instância, transformação maligna (GUPTA et al., 2009).

#### **2.4.2.1 Antioxidantes enzimáticos**

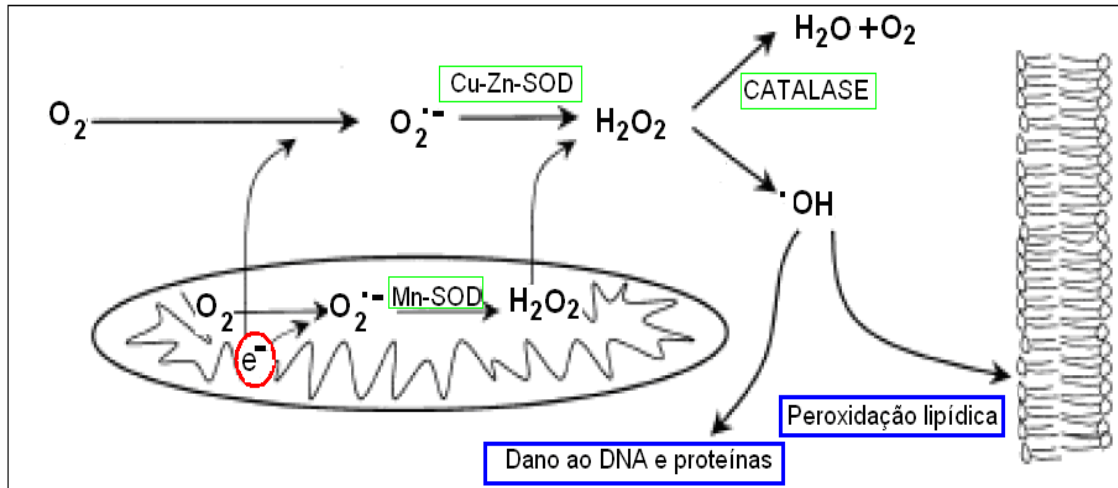
O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), a qual catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$ , a catalase (CAT), a qual atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$ , e a glutatona peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutatona como co-fator (VALKO et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2007; LEOPOLD; LOSCALZO, 2009).

A SOD constitui-se de uma metaloenzima abundante nas células aeróbias e uma das defesas antioxidantes enzimáticas mais efetivas. Esta metaloenzima é capaz de aumentar em 104 vezes a velocidade da reação de dismutação do radical  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  em pH fisiológico (VALKO et al., 2007). As enzimas SOD fazem parte do sistema de defesa enzimática contra o dano oxidativo, transformando o ânion radical superóxido em  $H_2O_2$ . Três tipos de SOD podem ser encontradas em tecidos de mamíferos: SOD contendo cobre-zinco (Cu-Zn) (SOD1) presente no citosol, SOD contendo manganês (Mn) (SOD2) encontrada na matriz mitocondrial e SOD extracelular (SOD3) (PISOSCHI; POP, 2015). A SOD1 encontra-se no citoplasma celular e nos fluidos extracelulares, onde é secretada pelas células endoteliais. Já a SOD2 é uma enzima mitocondrial tetramérica, apresentando um átomo de Mn por subunidade (SEIZI, 2003).

A CAT é uma enzima tetramérica, consistindo de quatro subunidades idênticas de 60 KDa, que contém um único grupo ferroprotoporfirina por unidade, e tem uma massa molecular de aproximadamente 240 KDa. É encontrada em praticamente todos os órgãos, estando particularmente concentrada nos hepatócitos, nos rins e nos eritrócitos. No interior das células, a CAT encontra-se dentro dos peroxissomos e sua atividade é dependente de NADPH (Figura 6) (VALKO et al., 2006).



Figura 6 – Mecanismo antioxidante enzimático.



Fonte: Adaptado de NORDBERG & ARNÉR (2001).

#### 2.4.2.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, os antioxidantes não enzimáticos também possuem grande importância no processo de defesa contra os danos causados por EROs. O organismo tem a habilidade de produzir compostos que apresentam grande capacidade de defesa antioxidante, direta ou indireta, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Entre os antioxidantes não enzimáticos, encontramos substâncias como a vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -caroteno e flavonoides (GUPTA et al., 2009), porém, destacam-se os compostos contendo grupos sulfidril (SH), chamados tióis, cuja capacidade de evitar a oxidação deve-se, geralmente, ao átomo de enxofre que pode facilmente acomodar a perda de elétron (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; MASSELLA et al., 2005).

Os tióis não-proteicos têm uma importante função na defesa contra as EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; MASSELLA et al., 2005). A glutathiona reduzida (GSH) é o tiol não-proteico mais abundante presente nas células animais (LI et al., 2001), a qual é formada por cisteína, glicina e resíduos de ácido glutâmico e sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento  $-SH$  presente na cisteína. Dentre as funções celulares desempenhadas pela GSH podemos destacar a capacidade de transformar as vitaminas C e E oxidadas em suas formas originais, sua participação na síntese e também no reparo da molécula

de DNA, sua utilização pelo fígado na desintoxicação de compostos tóxicos, e seu papel protetor frente às proteínas (TOWNSEND et al., 2003).

A GSH participa na decomposição do  $H_2O_2$ , potencialmente tóxico, que é convertido em água na reação catalisada pela GPx, às custas da GSH; a glutatona oxidada resultante é reciclada à forma reduzida pela glutatona redutase e NADPH. Dessa forma, este processo de reciclagem e consequente manutenção de níveis adequados de GSH pode prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (GIUSTARINI et al., 2011). A GSH pode ser considerada, então, um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a dos processos de iniciação tumoral (ARTEEL; SIES, 2001).

## 2.5 ENZIMAS QUE DEGRADAM ÉSTERES DE COLINA

### 2.5.1 Acetilcolina (ACh)

A acetilcolina (ACh) é um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico (SNP) e também na junção neuromuscular. A ACh, seus receptores e as enzimas responsáveis por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (WESSLER et al., 1998). A ACh é sintetizada pela colina acetiltransferase a partir da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídios da dieta, e acetil-CoA, um produto do metabolismo celular (SOREQ; SEIDMAN, 2001; PRADO et al., 2002). Após sua síntese, a ACh é captada por vesículas de armazenamento, principalmente nas terminações nervosas, nas quais permanece armazenada até a sua liberação (RAND, 2007).

Depois de ser liberada, a ACh se difunde na fenda sináptica e ativa receptores específicos, posicionados nas células pós sinápticas. A ACh é amplamente distribuída no SNC, onde seus efeitos são principalmente excitatórios, efetivados pela ativação de receptores específicos, designados como receptores colinérgicos e, subdivididos em dois grandes grupos: nicotínicos e muscarínicos, os quais transmitem os sinais por mecanismos diferentes (RANG et al., 2004). A ação da ACh é finalizada pela sua hidrólise enzimática na fenda sináptica pela enzima acetilcolinesterase (AChE). A colina liberada é, em parte, recaptada para o terminal pré-sináptico através de um mecanismo de recaptação de alta afinidade (SOREQ; SEIDMAN, 2001) onde poderá ser reutilizada para a síntese de novas moléculas de ACh.

## 2.5.2 Colinesterases

As colinesterases representam um grupo de enzimas que hidrolisam acetilcolina e outros ésteres de colina. Existem dois tipos principais de colinesterase com diferentes propriedades bioquímicas: a colinesterase específica, verdadeira ou AChE, a qual apresenta alta afinidade pela ACh e é inibida por altas concentrações da mesma. A outra é a colinesterase inespecífica, pseudocolinesterase ou butirilcolinesterase (BChE) sérica, a qual hidrolisa colina e ésteres alifáticos, tem menor afinidade pela ACh e não é inibida por altas concentrações da mesma (DAVIS et al., 1997).

A AChE é encontrada, predominantemente, no cérebro (10 vezes mais abundante que a BChE), junção neuromuscular e eritrócitos (COKUGRAS, 2003), enquanto a BChE é encontrada principalmente no plasma, rins, fígado, intestino, coração, pulmão e tem uma distribuição neuronal muito mais restrita do que a AChE (MESULAM et al., 2002).

### 2.5.2.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A função da AChE consiste na interrupção da ação da ACh nas junções de várias terminações nervosas colinérgicas com seus órgãos efetores ou locais pós-sinápticos (GOODMANN; GILMANN, 2006). A AChE apresenta um importante polimorfismo, já que existe em uma variedade de formas moleculares que podem ser classificadas como homoméricas ou heteroméricas, com base na associação com subunidades estruturais especializadas (MASSOULIE et al., 1993).

As formas homoméricas incluem as variedades globular monomérica (G1), dimérica (G2) e tetrâmera (G4) (TAYLOR; BROWN, 1999). A forma G1 é citosólica e a G4 encontra-se ligada à membrana, sendo esta última a mais encontrada no tecido nervoso (DAS et al., 2001; ALDUNATE et al., 2004). Em sangue humano, a AChE é encontrada tanto nos eritrócitos quanto no plasma, onde predominam as formas G2 e G4, respectivamente (RAKONCZAY et al. 2005). As formas heteroméricas, por sua vez, consistem em uma montagem das subunidades estrutural e catalítica, nas quais a ligação, através de pontes dissulfeto, de uma molécula tríplice helicoidal de colágeno a um, dois ou três tetrâmeros catalíticos resulta nas formas estruturais assimétricas A4, A8 e A12 (MASSOULIE et al., 1993).

### 2.5.2.2 Butirilcolinesterase (BChE)

A BChE é abundante no fígado e no plasma. É responsável pela hidrólise eficiente da butirilcolina, além de desempenhar um importante papel no metabolismo de alguns agentes anestésicos clinicamente importantes (por exemplo, succinilcolina e procaína) (BERNARDI et al., 2010). No plasma, a BChE ocorre predominantemente como um tetrâmero formado por dímeros de dímeros. Na formação de cada dímero, os monômeros estão ligados por pontes dissulfeto e, ao formar o tetrâmero, os dímeros ligam-se entre si por ligações não covalentes. Outras formas moleculares, como monômeros e dímeros, também estão presentes no plasma em menores proporções. Os monômeros são constituídos de 574 aminoácidos e nove cadeias de carboidratos, com peso molecular aproximado de 85 kDa (LOCKRIDGE et al., 1987 a, b).

A inflamação sistêmica é uma reação comum do hospedeiro à carcinogênese ou progressão do câncer, e níveis séricos de BChE tem sido relatados por refletirem a presença de inflamação e outras condições clínicas (SANTARPIA et al., 2006). Embora a função de "sistema colinérgico não-neuronal" ainda não esteja esclarecida, ela parece intervir em importantes processos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e reconhecimento de célula-célula (PALEARI et al., 2008). A BChE afeta a proliferação celular em virtude de seus efeitos antiapoptóticos, os quais podem apoiar os estágios iniciais da tumorigênese. Ela também desempenha um papel nos estágios finais da transformação, melhorando o crescimento celular independente da ancoragem, contribuindo para a ocorrência de metástase no câncer (SYED et al., 2008).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas, o perfil oxidativo e a atividade da BChE sérica em pacientes com câncer de tireoide.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a atividade da enzima E-NTPDase na hidrólise de ATP e ADP em plaquetas;
- Avaliar a atividade da enzima E-5'-NT em plaquetas;
- Avaliar a atividade da enzima ADA em plaquetas e no soro;
- Determinar a produção sérica de EROs;
- Avaliar a peroxidação lipídica;
- Avaliar a oxidação proteica;
- Avaliar os níveis de defesas antioxidantes;
- Avaliar a atividade sérica da BChE;
- Discutir o papel da sinalização purinérgica no câncer e no câncer de tireoide, e seu potencial como alvo terapêutico para o câncer por meio de um manuscrito de revisão.

## 4 MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois manuscritos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo o próprio manuscrito e, juntamente com o manuscrito de revisão, representam a íntegra deste estudo.

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas *Clinica Chimica Acta* (Manuscrito I), para o qual será submetido, e *Clinical and Experimental Medicine* (Manuscrito II), para a qual já foi submetido.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados demonstrados nos manuscritos contidos neste trabalho.

#### 4.1 Manuscrito I

### **ALTERATION OF THE ACTIVITY OF ENZYMES OF THE PURINERGIC SYSTEM, BUTYRYLCHOLINESTERASE AND THE OXIDATIVE PROFILE IN PATIENTS WITH THYROID CANCER**

Patrícia Bernardes Cavalheiro<sup>1</sup>, Viviane Martins Bernardes<sup>1</sup>, Juliana Sorraia de Oliveira<sup>2</sup>, Daniela Ferreira Passos<sup>1</sup>, Paulo Guilherme Schimittes<sup>1</sup>, Cinthia Melazzo de Andrade<sup>2</sup>, Daniela Bitencourt Rosa Leal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima n° 1000, Building 20, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Small Animal Clinic, Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima n° 1000, Building 97, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Correspondence to Daniela Bitencourt Rosa Leal

Tel: (55) 3220 9581

e-mail: [dbitencourtrosaleal@gmail.com](mailto:dbitencourtrosaleal@gmail.com)

[ORCID: 0000-0003-2618-9801](https://orcid.org/0000-0003-2618-9801)

**ABSTRACT**

**Introduction:** The incidence of thyroid cancer has been increasing in recent years. Many studies have demonstrated the involvement of purinergic signaling and oxidative stress in the progression of cancer, in addition to the involvement of butyrylcholinesterase (BChE) in tumorigenesis. We evaluated the activity of enzymes of the purinergic system, butyrylcholinesterase and the oxidative profile in thyroid cancer.

**Methods:** We determined the activity of the enzymes ectonucleoside triphosphate 5'-diphosphohydrolase (E-NTPDase/CD39), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT/CD73) and adenosine deaminase (E-ADA) in platelets of thyroid cancer patients, the oxidative profile of serum levels of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, protein carbonylation and total thiols (T-SHs) and reduced glutathione (GSH) levels, as well as the serum activity of BChE and ADA.

**Results:** The activity of E-NTPDase, both in the hydrolysis of adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP), was reduced in patients' platelets, as well as ADA activity, both in platelets and in serum. The activity of E-5'-NT was increased. We observed increased ROS production and lipid peroxidation, in addition to an increase in serum BChE activity.

**Conclusions:** The activity of ectonucleotidases, E-ADA, BChE and oxidative profile are altered in patients with thyroid cancer and correlate with the evolution of the disease.

**Key words:** thyroid cancer, purinergic signaling, oxidative stress, butyrylcholinesterase



## 1. Introduction

Thyroid cancer is the most common endocrine neoplasia, which accounts for about 2.1% of all cancer diagnoses worldwide, and about 77% of thyroid cancer diagnoses occur in women [1]. Thyroid cancer is three to five times more frequent in women than in men, and the annual percentage increase in incidence is generally higher in women [2].

Since the use of ultrasonography in the 1980s and the performance of fine needle aspiration biopsy, together with the increased use of imaging modalities such as magnetic resonance, computed tomography and Positron Emission Tomography (PET), early diagnosis of breast cancer declined [3,4]. Thyroid cancers are classified as: differentiated (papillary and follicular), undifferentiated (anaplastic) and medullary carcinomas, with the most frequent being papillary carcinomas, followed by follicular carcinomas. Differentiated carcinomas correspond to 90% of all thyroid neoplasms [5,6].

The presence of nodules in the thyroid has become a public health problem, since it is estimated that 10% of the population will develop a palpable nodule during life [7–9]. Although most cases of thyroid cancer show a good survival rate, a subset of cases demonstrates resistance to radioactive iodine and high rates of recurrence and metastasis [10,11].

The relevance of the participation of purinergic signaling, both in physiological and pathological conditions, has been progressively recognized in the last decades. The purinergic system, which consists of purinergic enzymes, adenine nucleotides ATP, ADP and adenosine monophosphate (AMP), and its nucleoside derivatives adenosine and inosine and purinergic receptors, participate in several types of cellular responses. Fundamental pathophysiological processes such as tissue homeostasis, neurodegeneration, immunity, inflammation and cancer are modulated by purinergic signaling [12].

Once released, nucleotides interact with specific purinergic receptors, mediating events involved in the immune response, inflammation, platelet aggregation, and others [13]. Extracellular ATP is classified as an important immune modulator [14], capable of controlling inflammation and immune response [15]. ADP in the extracellular medium acts as a primary mediator of platelet activation, contributing to homeostasis and thrombus formation, through its aggregatory effect after tissue damage [16]. Adenosine is known to have anti-inflammatory properties [17], vasodilators, neuroprotective [18], and immunosuppressive properties [19]. Adenosine-mediated immunosuppression is a critical physiological mechanism to protect tissues against excessive inflammation and promote tissue repair after injury. In the tumor microenvironment, this process is explored to decrease antitumor immunity and promote cancer progression [20].

The concentrations of nucleotides and adenosine in the extracellular compartment are controlled by ectoenzymes [21]. The enzyme E-NTPDase/CD39 catalyzes the hydrolysis of ATP and ADP, leading to the formation of AMP. E-5'-NT/CD73 is responsible for the degradation of AMP, culminating with the formation of adenosine [22,23]. In this way, E-NTPDase and E-5'-NT act together to convert ATP into adenosine. E-ADA, in turn, converts adenosine to inosine [24,25].

Patients with some type of neoplastic disease demonstrate a series of physiological changes, including the occurrence of thrombotic and inflammatory processes [26], in which adenine nucleotides and nucleosides act as important mediators and signaling agents [27,28]. Thus, the investigation of the activity profile of the enzymes that catalyze the degradation of these nucleotides in the extracellular environment in cancer patients is of great relevance. Both E-ADA and ectonucleotidases are enzymes linked to the platelet membrane.

In addition to the involvement of purinergic signaling in cancer physiology, it is known that chronic oxidative stress has serious implications for the initiation, growth, and development of cancer metastases [29]. Oxidative stress is defined as a state of imbalance between the production of free radicals, particularly ROS, and the body's ability to defend itself against these species [30]. At low levels, ROS participate of cell signaling. However, at high levels, they can cause irreversible oxidative damage to lipids, proteins and DNA, interfering with vital cellular functions [31]. High levels of ROS can contribute to carcinogenesis, promoting the survival, proliferation and metastasis of tumor cells [32]. The damage caused by the oxidative stress is minimized by the antioxidant defense system, including enzymatic and non-enzymatic systems [33]. Among the non-enzymatic antioxidants, we found the organic compounds containing sulfhydryl groups (SH), called thiols. GSH is the main representative of non-protein thiols due to their abundance in cells [34]. Any change in one of these systems can break the balance between producing and eliminating ROS by causing cellular damage and, ultimately, malignant transformation [35].

The correlation of cholinesterase activity with tumorigenesis, proliferation and cell differentiation has been observed [36–38]. Cholinesterase represents a group of enzymes that hydrolyze acetylcholine (ACh) and other choline esters, which is formed by two main types of cholinesterase: true cholinesterase or acetylcholinesterase (AChE) and pseudocholinesterase or BChE [39]. AChE and BChE, to a lesser extent, limit the action of ACh on cholinergic synapses and neuromuscular junctions [40]. Although the "non-neuronal cholinergic system" function has not yet been elucidated, it seems to mediate important cellular processes such as proliferation, differentiation, apoptosis and cell-cell recognition [41]. Studies have

demonstrated that BChE levels can be used as a biochemical marker for monitoring head and neck cancer and cervical cancer [42].

A better understanding of the molecular mechanisms involved in the progression of malignant thyroid tumors, as well as the need for the use of new biomarkers to monitor the evolution of this neoplasm, are of great relevance for the development of more effective therapeutic strategies, with consequent improvement in the clinical picture and prognosis of patients with thyroid cancer. Considering the involvement of purinergic signaling in the pathophysiology of cancer and thromboembolic processes, the occurrence of high oxidative stress in different types of cancer, and the involvement of BChE in cellular processes such as proliferation, differentiation, and apoptosis with possible influence on tumorigenesis, we performed a series of analysis. We determined the activity of the purinergic enzymes E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA in platelets of patients with thyroid cancer. ADA and BChE activities in serum were also performed. We also investigated the oxidative profile of these patients from the determination of the serum levels of ROS, TBARS, and carbonylation of proteins, as well as the antioxidant profile by determining the levels of T-SHs and GSH.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Chemicals**

The substrates ATP, ADP, AMP, adenosine, 5,5-dithio-bis(-2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Coomassie Brilliant Blue G and Trizma base were purchased from Sigma Chemical Co. All reagents used in this experiment were of the highest purity.

### **2.2. Patients and samples**

The study population consisted of 19 patients with thyroid cancer (Ca thyroid group), from the Hospital of the Federal University of Santa Maria. The diagnosis of thyroid carcinoma was made from the performance of fine needle aspiration biopsy of nodules above 1.0 cm. A group of 25 healthy individuals was used as the control group. Smoking or alcoholism subjects with diabetes mellitus, hypertension, rheumatoid arthritis or other pathology were excluded from the study.

Blood samples were collected in vacuum tubes with 3.5% sodium citrate as the anticoagulant (for platelet analysis) and in tubes without anticoagulant (for serum analysis).

About ten milliliters of blood were collected from each patient to perform the experiments. All individuals who participated in the study provided written consent for their participation. The Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria approved the protocol under No. 1.343.790.

### 2.3. Isolation of platelets and determination of proteins

For platelet isolation, platelet rich plasma (PRP) was separated from blood collected with anticoagulant sodium citrate, according to the method of Pilla et al. [43], modified by Lunkes et al. [44]. Briefly, blood was collected in vacuum tubes and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. Thereafter, the PRP was centrifuged at 3500 rpm for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, which contained 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and the protein was adjusted to 0.4 to 0.6 mg/mL for the determination of the activities of the purinergic ectoenzymes.

Proteins were determined by the Coomassie blue method, using bovine serum albumin as standard, as described by Bradford [45].

### 2.4. Serum separation

To obtain serum, blood was collected in a tube without anticoagulant and, after clot formation, centrifuged at 3,500 rpm for 15 minutes. The serum was withdrawn and the precipitate discarded. In serum, the levels of ROS, TBARS, carbonylation of proteins, T-SHs, GSH and the activity of BChE and E-ADA will be determined.

### 2.5. Determination of the activity of E-NTPDase and E-5'-NT

The activities of the ectonucleotidases were determined using a PRP preparation according to Pilla et al. [43]. Briefly, to determine the activity of E-NTPDase, 20  $\mu$ L of the PRP preparation were mixed into the system, which contained 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of 20  $\mu$ L of ATP or ADP (1 mM) as the substrate. For AMP hydrolysis, E-5'-NT activity was determined as described above except that 5 mM CaCl<sub>2</sub> was replaced with 10 mM MgCl<sub>2</sub> and the added nucleotide was 2 mM AMP. Both reactions were stopped by the addition of 200  $\mu$ L of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Then the dosage of the released inorganic phosphate (Pi) followed the Chan method using KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as standard and malachite green as a colorimetric reagent. The enzymatic preparation was added only to the controls after the addition of TCA for correction of the hydrolysis of non-enzymatic

nucleotides. Samples were collected in triplicate with enzymatic activity reported in nmol of released Pi/min/mg protein.

#### 2.6. Determination of E-ADA activity

The activity of E-ADA in platelets and serum was determined according to Giusti and Galanti [46], whose method is based on the direct production of ammonia when the E-ADA produces ammonia by excessive adenosine. Briefly, 50  $\mu$ L of platelets or serum was added to 21 mmol/L adenosine, pH 6.5 and incubated at 37 ° C for 60 min. After phenol 106.2 mmol/L, sodium nitroprusside 167.8 nmol/L and hypochlorite solution were added to the reaction and incubated at 37 ° C for a further 30 min. For the standard, ammonium sulfate of 75  $\mu$ mol/L was used. Protein content was adjusted in the range 0.4-0.6 mg/mL for platelets. All samples were analyzed in triplicate and ADA activity was shown in U ADA/mg protein for platelets and U/L for serum.

#### 2.7. Determination of ROS production

The levels of 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) were determined as an index of production of reactive species by cellular components [47]. 50  $\mu$ L aliquots of serum were added to a medium containing Tris-HCl buffer (0.01 mM, pH 7.4) and 2'-7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) (1 mM). After addition of DCFH-DA, the medium was incubated in the dark for 1 hr until the fluorescence measurement procedure (excitation at 488 nm and emission at 525 nm, both slit widths were 1.5 nm). The oxidized DCF was determined using a standard curve of oxidized DCF and the results were expressed as DCFH-DA fluorescence.

#### 2.8. Determination of lipid peroxidation

Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined according to Jentzsch et al. [48], by determining the concentration of malondialdehyde (MDA) as a product of lipid peroxidation through the reaction with thiobarbituric acid (TBA). Briefly, the reaction mixture containing 200  $\mu$ L of serum or standard (0.03 mM MDA), 1 mL of 0.2 M orthophosphoric acid and 250  $\mu$ L thiobarbituric acid (0.1 M) was heated at 95 ° C for 120 min. The absorbance was measured at 532 nm. Serum TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein.

### 2.9. Determination of carbonyl protein levels

Carbonylation of proteins was determined by the method of Levine et al. [49] and modified by Reznick and Packer [50]. A 10 mM 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) containing medium and hydrochloric acid (HCl) was added to the protein precipitate and incubated at room temperature for 1 h. During the incubation, the serum samples were vigorously mixed every 15 min. 500  $\mu$ L of denaturation buffer (3% sodium dodecyl sulfate (SDS)) plus 2000  $\mu$ L of ethanol and 2000  $\mu$ L of heptane were then added. The samples were resuspended in 1000  $\mu$ L of denaturation buffer and placed in a water bath for about 20 minutes (40 ° or 50 ° C) until the pellets were dissolved. The reading was performed at 370 nm on the UV-VIS spectrophotometer. The results were expressed as nmol carbonyl/mg total protein.

### 2.10. Determination of T-SHs and GSH

T-SHs were analyzed spectrophotometrically by the method of Boyne and Ellman [51], with some modifications. An aliquot of 200  $\mu$ L of serum in a final volume of 900  $\mu$ L of solution was used for the reaction. The reaction product was measured at 412 nm after the addition of 50  $\mu$ L of 10 mM DTNB. A standard curve using cysteine was added to calculate the thiol group content in the samples and was expressed as nmol of T-SH/mg protein.

GSH was measured spectrophotometrically with the Ellman reagent [52]. An aliquot of 200  $\mu$ L of serum in a final volume of 900  $\mu$ L of solution was used for the reaction. The reaction product was measured at 412 nm after the addition of 50  $\mu$ L of 10 mM DTNB. A standard curve using glutathione was added to calculate the GSH content in the samples and the content was expressed as nmol of GSH/mL serum.

### 2.11. Determination of BChE activity

Serum BChE activity was determined by the method of Ellman et al. [53]. The 0.1 mol potassium phosphate buffer system with pH 7.4, 0.30 mmol DTNB and 50  $\mu$ L serum were incubated for 2 min at 30 ° C and the reaction was started by the addition of the butyrylcholine substrate at the concentration of 1 mmol. The reading was performed by the spectrophotometry method of 2 min at 412 nm. The enzymatic activity was expressed in  $\mu$ mol of BcSCh/h/mg of protein.

### 2.12. Statistical analysis

All variables were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. The differences between the groups were analyzed by the unpaired Student's t test, considered

significant when  $P < 0.05$ . The results were shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (mean  $\pm$  SEM).

### 3. Results

#### 3.1. General characteristics of patients with thyroid cancer and controls

Nineteen patients with thyroid cancer (14 women and 5 men) from the University Hospital of Santa Maria, together with the control group composed by twenty-five healthy individuals (24 women and 1 man) were selected for the study. Table 1 shows the general characteristics of patients with thyroid cancer and controls.

#### 3.2. E-NTPDase and E-5'-NT activity in platelets

Figures 1A and 1B demonstrate the hydrolysis of ATP and ADP, respectively, by E-NTPDase in platelets from patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. The hydrolysis of ATP (Figure 1A) in patients with thyroid cancer showed a significant reduction in relation to the control group ( $16.42 \pm 2.167$  vs.  $22.26 \pm 0.961$  nmol Pi/min/mg protein, respectively,  $P < 0.05$ ). The hydrolysis of ADP (Figure 1B) in patients with thyroid cancer, similar to ATP hydrolysis, showed a significant reduction in relation to the control group ( $7.594 \pm 1.167$  vs.  $20.14 \pm 1.318$  nmolPi/min/mg protein, respectively,  $P < 0.05$ ).

Figure 1C demonstrates the hydrolysis of AMP by E-5'-NT in platelets of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. Hydrolysis of AMP in patients with thyroid cancer showed a significant increase in relation to the control group ( $9,275 \pm 2,358$  vs.  $4,727 \pm 0,486$  nmolPi/min/mg protein, respectively,  $P < 0.05$ ).

#### 3.3. ADA activity in platelets and serum

The results obtained for adenosine deamination by E-ADA activity in platelets of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group are represented in Figure 2A. Adenosine deamination in patients with thyroid cancer showed a significant reduction ( $7.594 \pm 1.167$  U ADA/mg protein) compared to the control group ( $20.14 \pm 1.318$  U ADA/mg protein) ( $P < 0.05$ ).

The results of serum ADA activity are shown in Figure 2B. In the serum, adenosine deamination in patients with thyroid cancer also showed a significant reduction ( $21.73 \pm 1.899$  U/L) compared to the control group ( $29.11 \pm 2.365$  U/L) ( $P < 0.05$ ).

### 3.4. ROS levels

The results presented in Figure 3A show a significant increase in ROS production by thyroid cancer patients compared to the control group ( $5.302 \pm 0.513$  vs.  $3.818 \pm 0.363$  DCFH-DA fluorescence, respectively,  $P < 0.05$ ).

### 3.5. Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by determination of TBARS levels in the group of patients with thyroid cancer and in the control group. The results presented in Figure 3B show a significant increase in TBARS levels in the group of patients with thyroid cancer ( $4.201 \pm 0.602$  nmol MDA/mg protein,  $P < 0.05$ ) when compared to the control group ( $2.720 \pm 0.222$  nmol MDA/mg protein).

### 3.6. Determination of carbonyl protein levels

Protein oxidation was determined by the carbonyl protein content in the patient's serum samples and the control group. By analyzing Figure 3C we can observe that, although carbonyl protein levels are higher in the group of patients with thyroid cancer, we did not observe a significant increase of these levels in serum of cancer patients, when compared to the control group ( $0.02312 \pm 0.001374$  vs.  $0.02054 \pm 0.0008115$  nmol carbonyl/mg total protein, respectively,  $P > 0.05$ ).

### 3.7. T-SHs and GSH levels

The levels of T-SHs in the group of patients with thyroid cancer did not present a significant difference when compared to the levels in the serum of the control group, as shown in Figure 4A ( $932.3 \pm 40.54$  vs.  $971.6 \pm 51, 52$  nmol TSH/mg protein, respectively,  $P > 0.05$ ).

The same occurred with respect to GSH levels (Figure 4B), which did not present a significant difference between patients with thyroid cancer and the control group ( $37.01 \pm 0.217$  vs.  $36.78 \pm 0.341$  nmol GSH/ml serum, respectively).

### 3.8. BChE activity

The serum activity of BChE in the group of patients with thyroid cancer was significantly elevated ( $4,018 \pm 0,404$   $\mu$ mol BcSCh/h/mg protein,  $P < 0.05$ ) compared to the activity in the control group ( $2,889 \pm 0,2199$   $\mu$ mol BcSCh/h/mg protein), as shown in Figure 5.



#### 4. Discussion

Several studies have shown changes in adenine nucleotide hydrolysis in various pathological conditions, including breast cancer, prostate cancer and cervical neoplasia [28]. These results reinforce the close relationship between neoplastic diseases and the activity of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides.

In a study of papillary thyroid cancer cells, it was shown that cancer cells had an intracellular and extracellular ATP concentration at least 3-fold higher than control cell concentrations [54]. Our results showed a significant reduction of ATP hydrolysis in platelets of cancer patients, possibly followed by an increase in the extracellular concentration of ATP. ATP release is not only a consequence of damage to tumor stroma or host cells, nor a byproduct of inflammatory cell activation, but a process closely involved in cancer cell metabolism and antitumor immunity [55].

It is believed that ATP has properties that protect against tumor growth, as reported in a review by Abraham et al. [56], in part, causing apoptotic death of tumor cells. Maldonado et al. [57], by evaluating the changes in extracellular hydrolysis of adenine nucleotides in platelets of patients with cervical intraepithelial neoplasia at different stages and in invasive uterine cancer, observed a decrease in E-NTPDase activity at all stages when compared to the control group. The reduction of the ATP hydrolysis in this study could represent an attempt of general protection exerted by the cells, which would be "fighting" against the presence of tumor cells.

Analyzing the hydrolysis of ADP, we observed a significant reduction of ADP hydrolysis in platelets of patients with thyroid cancer. It is known that ADP has the property of recruiting circulating platelets, which can cause undesirable formation of a thrombus [58]. A decrease in the ADP hydrolysis favors the accumulation of this nucleotide in the extracellular environment, which may promote an amplification of the platelet aggregation phenomenon [59,60]. The literature demonstrates that cancer patients are predisposed to have thromboembolic changes, which may be a consequence of the decrease of this hydrolysis [61].

Zanini et al. [26], observed a significant reduction of the ADP hydrolysis in the platelets of patients with lung cancer, as well as a significant increase of the platelet aggregation in comparison with the control group when ADP was used as an agonist. These increases were suggested by the authors to be a consequence of ADP accumulation in the extracellular environment.

In relation to AMP hydrolysis, we observed a significant increase in AMP hydrolysis in platelets of patients with thyroid cancer in relation to the control group. This result may indicate a possible improvement in the formation of adenosine as a reflection of the presence of the

tumor, since adenosine acts as a tumor-promoting agent. Kondo et al. [62] demonstrated an overexpression and high activity of E-5`-NT in follicular cells of papillary thyroid carcinoma, and low expression and activity in follicular cells of normal thyroid, nodular goiter and follicular adenoma. The authors suggested that, clinically, the strong expression of CD73 in papillary thyroid carcinomas could help in the differential diagnosis of thyroid tumors.

CD73 expression is significantly increased in cancerous tissues, accompanied by high enzymatic activity, and may mediate the production of extracellular adenosine [63]. The increase in E-5`-NT activity observed in patients with thyroid cancer in our study corroborates with the results available in the literature for different types of tumors. The E-5`-NT activity was elevated in mammary carcinoma [64], gastric cancer [65], pancreatic [66] and glioblastoma [67].

Adenosine is one of the molecules with the highest concentration within the tumor microenvironment [22,68] and is involved in the process of tumor-associated immunosuppression. It has also been suggested that adenosine may regulate vascular supply to neoplastic tissue and thus influence tumor growth [69]. By analyzing the results of the ADA activity obtained in our study, we observed a significant reduction in the deamination of adenosine in both platelets and serum of patients with thyroid cancer when compared the control group, which may result in increased levels of extracellular adenosine. linking the increased hydrolysis of AMP with the reduction of adenosine deamination in the patients evaluated in our study, we can suggest the occurrence of a mechanism capable of producing the elevation of extracellular levels adenosine in thyroid cancer.

In one study, which evaluated ADA activity in serum and platelets of prostate cancer patients, the researchers observed a reduction in ADA activity in both platelets and serum of patients with advanced prostate cancer, suggesting a consequent elevation of the extracellular concentration of adenosine in these patients. Researchers have indicated that increased levels of adenosine produced by tumors may be associated with the development of drug resistance and a more aggressive course of the disease [70]. Other studies have demonstrated that the determination of ADA activity may be useful in the diagnosis and/or monitoring of malignant processes [64].

As well as the involvement of purinergic signaling in tumor progression has been pointed out, oxidative stress has also been shown to play an important role during initiation, promotion and tumor progression [72]. Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of free radicals, also known as oxidants or EROs and their elimination through protective mechanisms, defined as antioxidants [73]. This imbalance causes damage to the

biomolecules essential to the cells and has a potential impact on the organism [74]. EROs play a crucial role in physiological and pathophysiological processes [75]. Elevated levels of ROS can contribute to carcinogenesis, and the signaling mediated by them may promote the survival, proliferation, and metastasis of tumor cells [32]. High production of ROS and persistent oxidative stress have been recognized as characteristics of carcinoma cells *in vivo* and *in vitro* [76–78].

The relationship between EROs and cancer is well established, once EROs may contribute to the neoplastic transformation of cells [30,79]. In our study, we observed a significant increase in ROS production by thyroid cancer patients. Because of their high reactivity, ROS react with all types of biological molecules. Thus, persistent high concentrations of EROs can damage several cellular and extracellular constituents, including DNA, proteins and lipids [80], initiating lipid peroxidation, inactivating enzyme systems and altering the cellular antioxidant defense system [81]. We evaluated some serum markers of redox balance to reflect the damage caused by ROS and the efficacy of some of the body's antioxidant defenses in thyroid cancer patients and controls.

For the evaluation of lipid peroxidation, we determined the serum levels of TBARS. The main target of ERO peroxidation is the polyunsaturated fatty acids that are part of the membrane lipids, leading to the formation of lipid peroxides [82]. In our study, we observed a significantly elevated production of TBARS by thyroid cancer patients. Our results are consistent with other studies that have evaluated lipid peroxidation in other types of cancers, such as uterine cervix, head and neck, and prostate cancer [35,83,84].

We also evaluated protein oxidation by determining serum levels of carbonylated proteins. Although we observed an increase in the levels of carbonylated proteins in patients with thyroid cancer, this increase was not significant. EROs modulate the function of all classes of biomolecules, targeting all cellular components. Since lipids are the substances most susceptible to oxidation by the action of ROS [85], in our study, increased levels of carbonylated proteins were not as pronounced as the increase in TBARS levels, which represent a significant increase in lipid peroxidation in patients with thyroid cancer.

We also did not observe a significant difference between the levels of T-SHs and GSH in patients with thyroid cancer and the control group. In physiological conditions, the cells are able to counterbalance the harmful effects of ROS through the antioxidant defense system, which consists of enzymatic and non-enzymatic free radical neutralizers, such as T-SHs and GSH. Antioxidant defense systems work together to minimize oxidative stress caused by increased free radical production [35]. Many studies evaluating antioxidant defenses in patients

with various types of cancer have demonstrated a reduction in the levels of these substances in patients [35,86].

However, Maldonado et al. [83], when assessing GSH levels in patients newly diagnosed with cervical cancer, observed an increase in GSH levels in these patients when compared to controls, attributing this elevation to the action of the antioxidant defense that occurs at the beginning of the neoplastic transformation with the objective of preventing tissue damage caused by oxidative stress. All patients who participated in our study at the time of sample collection had clinically palpable nodules, indicating that the tumor had already evolved from a microcarcinoma to a larger tumor, and that they were no longer at an early stage of the disease. Probably, due to the more advanced tumor stage, we did not observe significant alterations in the levels of GSH and T-SHs in patients with thyroid cancer. This "failure" of the antioxidant system correlates with the high production of EROs and TBARS observed in the blood circulation of these patients.

The correlation between cholinesterase activity and cancer has also been studied. BChE affects cell proliferation by showing antiapoptotic effects that may support the early stages of tumorigenesis. It also plays a role in the later stages of cell transformation, contributing to cell growth, and development of cancer metastasis [87]. In our study, we observed that the activity of BChE in patients with thyroid cancer was significantly higher than healthy individuals. Similarly results were found by Prabhu et al. [88], which determined the serum activity of BChE in patients with oral cancer prior to therapy and observed that cancer patients had BChE activity significantly higher than controls.

In another study, which evaluated the histochemical activity of BChE in brain tumors, the researchers demonstrated that in less aggressive brain tumors BChE activity was low or moderate, whereas in aggressive tumors the activity was elevated. Regarding cell growth, they observed that in type IV gliomas, which show rapid growth, BChE activity was higher, whereas in type II and III gliomas BChE activity was moderate or low and cell growth slow or intermediate [89]. Thus, the researchers suggested a relationship between the level of BChE and the rate of cell growth in brain tumors. In our study, we observed a similar situation, since, as previously reported, the patients in our study had palpable nodules, signaling that the tumor was not in an early stage of development, a situation that correlates with the high activity of BChE observed in these patients. Robitzki et al. [90] demonstrated that BChE blockade inhibits cell proliferation and differentiation.

## 5. Conclusion

We have demonstrated changes in the activities of the purinergic and cholinergic enzymes and in the oxidative profile of patients with thyroid cancer during tumor progression. We emphasize the increase in the activity of E-5'-NT and the reduction of ADA activity, which may suggest the occurrence of a mechanism capable of raising the extracellular levels of adenosine, a molecule involved in the progression of tumors. The absence of an increase of the antioxidant defense mechanisms combined to high levels of ROS resulted in oxidative stress, leading to an increase in the lipid peroxidation in patients with thyroid cancer. The high activity of BChE in patients, demonstrated in our study, may be linked with a more advanced stage of tumor progression. Therefore, these parameters may represent future targets for treating and monitoring the evolution of this neoplasia, improving the prognosis of patients with thyroid cancer.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP), Hospital Universitário de Santa Maria and Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH).

## References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [internet site]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013 [accessed on September 27, 2014], (n.d.).
- [2] B.A. Kilfoy, T. Zheng, T.R. Holford, X. Han, M.H. Ward, A. Sjodin, Y. Zhang, Y. Bai, C. Zhu, G.L. Guo, International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973–2002, *Cancer Causes Control*. 20 (2009) 525–531.
- [3] W.D. Kent, S.F. Hall, P.A. Isotalo, R.L. Houlden, R.L. George, P.A. Groome, Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease, *Cmaj*. 177 (2007) 1357–1361.
- [4] J.A. Sosa, J.W. Hanna, K.A. Robinson, R.B. Lanman, increases in thyroid nodule fine-needle aspirations, operations, and diagnoses of thyroid cancer in the United States, *Surgery*. 154 (2013) 1420–1427.
- [5] F. Monaco, Classification of thyroid diseases: suggestions for a revision, *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 88 (2003) 1428–1432.
- [6] L. Hegedüs, The thyroid nodule, *N. Engl. J. Med*. 351 (2004) 1764–1771.
- [7] T.W. Furlanetto, S. Peccin, S.M.A. de O, Z.A. dos S, P.S. dos Reis, S.K. Genro, E. V Ferreira, F. Bittelbrum, A.S. Müller, R.W. Silva, Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women, *Rev. Assoc. Med. Bras*. 46 (2000) 331.

- [8] M.J. Schlumberger, M. Torlantino, Papillary and follicular thyroid carcinoma, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14 (2000) 601–613.
- [9] M.J. Welker, D. Orlov, Thyroid nodules., *Am. Fam. Physician.* 67 (2003) 559.
- [10] D.S.A. McLeod, A.M. Sawka, D.S. Cooper, Controversies in primary treatment of low-risk papillary thyroid cancer, *Lancet.* 381 (2013) 1046–1057.
- [11] M. Xing, Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer, 13 (2013) 184–199.
- [12] F. Di Virgilio, E. Adinolfi, Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth, *Oncogene.*
- [13] G. Burnstock, Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission., *Physiol. Rev.* 87 (2007) 659–797.
- [14] L. Vitiello, S. Gorini, G. Rosano, A. la Sala, Immunoregulation through extracellular nucleotides., *Blood.* 120 (2012) 511.
- [15] F. Di Virgilio, Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells, *Purinergic Signal.* 1 (2005) 205–209.
- [16] A. Borowiec, K. Lechward, K. Tkacz-Stachowska, A.C. Składanowski, Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases, *Acta Biochim. Pol.* 53 (2006) 269–278.
- [17] B.N. Cronstein, Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent., *J. Appl. Physiol.* (Bethesda, Md. 1985). 76 (1994) 5.
- [18] K.A. Jacobson, Z.-G. Gao, Adenosine receptors as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 247.
- [19] J. Spychala, B.S. Mitchell, J. Barankiewicz, Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase, and 5'-nucleotidase., *J. Immunol.* (Baltimore, Md. 1950). 158 (1997) 4947.
- [20] B. Allard, P.A. Beavis, P.K. Darcy, J. Stagg, Immunosuppressive activities of adenosine in cancer, *Curr. Opin. Pharmacol.* 29 (2016) 7–16.
- [21] H. Zimmermann, Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides, *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 362 (2000) 299–309.
- [22] A. Ohta, E. Gorelik, S.J. Prasad, F. Ronchese, D. Lukashev, M.K.K. Wong, X. Huang, S. Caldwell, K. Liu, P. Smith, A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 13132–13137.
- [23] G. Haskó, J. Linden, B. Cronstein, P. Pacher, Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 759.
- [24] D.E. Lukashev, P.T. Smith, C.C. Caldwell, A. Ohta, S.G. Apasov, M. V Sitkovsky, Analysis of A2a receptor-deficient mice reveals no significant compensatory increases in the expression of A2b, A1, and A3 adenosine receptors in lymphoid organs, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 2081–2090.
- [25] D.W. Hoskin, J.S. Mader, S.J. Furlong, D.M. Conrad, J. Blay, Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells, *Int. J. Oncol.* 32 (2008) 527–535.
- [26] D. Zanini, R. Schmatz, V.C. Pimentel, J.M. Gutierrez, P.A. Maldonado, G.R. Thomé, A.M. Cardoso, N. Stefanello, L. Oliveira, J. Chiesa, D.B.R. Leal, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets, *Biomed. Pharmacother.* 66 (2012) 40–45.
- [27] G. Burnstock, Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling., *Clin. Med.* 2 (2002) 45.
- [28] M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, C.D. Bonan, A.T. Wyse, ntpdase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health, *Biofactors.* 31 (2007) 77–98.
- [29] A. Costa, A. Scholer-Dahirel, F. Mechta-Grigoriou, The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment, *Semin. Cancer Biol.* 25 (2014) 23–32.

- [30] J.A. Cook, D. Gius, D.A. Wink, M.C. Krishna, A. Russo, J.B. Mitchell, Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment, in: *Semin. Radiat. Oncol.*, Elsevier. 14 (2004) 259–266.
- [31] J.P. Fruehauf, F.L. Meyskens Jr, Reactive oxygen species: a breath of life or death?, *Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13 (2007) 789.
- [32] W.-S. Wu, The signaling mechanism of ROS in tumor progression, *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 695–705.
- [33] M.B. Azad, Y. Chen, S.B. Gibson, Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and Treatment, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 777–790.
- [34] D.J. Reed, Glutathione: toxicological implications, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30 (1990) 603–631.
- [35] A. Gupta, M.L. Bhatt, M.K. Misra, Lipid peroxidation and antioxidant status in head and neck squamous cell carcinoma patients, *Oxid Med Cell Longev.* 2 (2009) 68–72.
- [36] H. Zakut, G. Ehrlich, A. Ayalon, C.A. Prody, G. Malinger, S. Seidman, D. Ginzberg, R. Kehlenbach, H. Soreq, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas., *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 900–908.
- [37] D.H. Small, S. Michaelson, G. Sberna, Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* 28 (1996) 453–483.
- [38] V. Bradamante, D. Bukovi, J. Geber, D. Matani, Plasma Cholinesterase Activity in Patients with Uterine Cervical Cancer during Radiotherapy, 24 (2000) 373–380.
- [39] L. Santarpia, I. Grandone, F. Contaldo, F. Pisanisi, Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: A review of the literature, *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 4 (2013) 31–39.
- [40] S. Nieto-Cerón, H. Vargas-López, M. Pérez-Albacete, I. Tovar-Zapata, P. Martínez-Hernández, J.N. Rodríguez-López, J. Cabezas-Herrera, Analysis of cholinesterases in human prostate and sperm: implications in cancer and fertility, *Chem. Biol. Interact.* 187 (2010) 432–435.
- [41] L. Paleari, A. Grozio, A. Cesario, P. Russo, The cholinergic system and cancer, in: *Semin. Cancer Biol.*, Elsevier. 18 (2008) 211–217.
- [42] A. Chougule, S. Hussain, D.P. Agarwal, Prognostic and diagnostic value of serum pseudocholinesterase, serum aspartate transaminase, and serum alinine transaminase in malignancies treated by radiotherapy, *J. Cancer Res. Ther.* 4 (2008) 21–25.
- [43] C. Pilla, T. Emanuelli, S.S. Frassetto, A.M. Battastini, R.D. Dias, J.J. Sarkis, ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6. 1.5) in human blood platelets., *Platelets.* 7 (1996) 225.
- [44] G.I. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti, M.R.C. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.* 109 (2003) 189–194.
- [45] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [46] G. Giusti, B. Galanti, Colorimetric method, *Methods Enzym. Anal.* 3 (1984) 315–323.
- [47] O. Myhre, J.M. Andersen, H. Aarnes, F. Fonnum, Evaluation of the probes 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1575–1582.
- [48] A.M. Jentsch, H. Bachmann, P. Fürst, H.K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 251–256.
- [49] R.L. Levine, J.A. Williams, E.P. Stadtman, E. Shacter, [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, in: *Methods Enzymol.*, Elsevier. 233 (1994) 346–357.
- [50] A.Z. Reznick, L. Packer, [38] Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, in: *Methods Enzymol.*, Elsevier. 233 (1994) 357–363.
- [51] A.F. Boyne, G.L. Ellman, A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components, *Anal. Biochem.* 46 (1972) 639–653.
- [52] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [53] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.

- [54] A. Solini, S. Cuccato, D. Ferrari, E. Santini, S. Gulinelli, M.G. Callegari, A. Dardano, P. Faviana, S. Madec, F. Di Virgilio, F. Monzani, Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: A new potential marker of the disease?, *Endocrinology*. 149 (2008) 389–396.
- [55] F. Ghiringhelli, L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors, *Nat. Med.* 15 (2009) 1170.
- [56] E.H. Abraham, A.Y. Salikhova, E. Rapaport, ATP in the treatment of advanced cancer, *Curr. Top. Membr.* (2003) 415–452.
- [57] P.A. Maldonado, V.C. Pimentel, L.A. Negrini, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer, *Biomed. Pharmacother.* 66 (2012) 6–11.
- [58] H.S. Park, S.M. Hourani, Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelets., *Br. J. Pharmacol.* 127 (1999) 1359.
- [59] K. Enjyoji, J. Sévigny, Y. Lin, P.S. Frenette, P.D. Christie, J.S.A. Esch, M. Imai, J.M. Edelberg, H. Rayburn, M. Lech, Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation., *Nat. Med.* 5 (1999).
- [60] A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H.F. Drosopoulos, D.J. Pinsky, N. Islam, R.B. Gayle III, C.R. Maliszewski, Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 178–182.
- [61] P. Prandoni, A. Falanga, A. Piccioli, Cancer and venous thromboembolism, *Lancet Oncol.* 6 (2005) 401–410.
- [62] T. Kondo, T. Nakazawa, S.I. Murata, R. Katoh, Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas [5], *Histopathology*. 48 (2006) 612–614.
- [63] D. Jin, J. Fan, L. Wang, L.F. Thompson, A. Liu, B.J. Daniel, T. Shin, T.J. Curiel, B. Zhang, CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression, *Cancer Res.* 70 (2010) 8–5472.
- [64] O. Canbolat, I. Durak, R. Çetin, M. Kavutcu, S. Demirci, S. Öztürk, Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues, *Breast Cancer Res. Treat.* 37 (1996) 189–193.
- [65] İ. Durak, H. Perk, M. Kavutçu, O. Canbolat, Ö. Akyol, Adenosine deaminase, 5' nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues, *Free Radic. Biol. Med.* 16 (1994) 825–831.
- [66] K. Flocke, H.G. Mannherz, Isolation and characterization of 5'-nucleotidase of a human pancreatic tumor cell line, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1076 (1991) 273–281.
- [67] M.R. Wink, E. Braganhol, A.S.K. Tamajusuku, E.A. Casali, J. Karl, M.L. Barreto-Chaves, J.J.F. Sarkis, A.M.O. Battastini, Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions, *Neurochem. Int.* 43 (2003) 621–628.
- [68] J. Blay, T.D. White, D.W. Hoskin, The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine, *Cancer Res.* 57 (1997) 2602–2605.
- [69] J.W. Phillis, P.H. Wu, Adenosine may regulate the vascular supply and thus the growth and spread of neoplastic tissues: a proposal, *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 12 (1981) 309–310.
- [70] J. Szychala, J. Kitajewski, Wnt and  $\beta$ -catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation, *Exp. Cell Res.* 296 (2004) 99–108.
- [71] M. Aghaei, F. Karami-Tehrani, S. Salami, M. Atri, Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: The assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 887–891.
- [72] J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis, The role of oxidative stress in carcinogenesis., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 239–267.
- [73] S. Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal, Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1603–1616.



- [74] Z. Ďuračková, Some Current Insights into Oxidative Stress., *Physiol. Res.* 59 (2010).
- [75] B. D'Autréaux, M.B. Toledano, ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 813.
- [76] T.P. Szatrowski, C.F. Nathan, Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells., *Cancer Res.* 51 (1991) 794.
- [77] S. Toyokuni, K. Okamoto, J. Yodoi, H. Hiai, Persistent oxidative stress in cancer., *FEBS Lett.* 358 (1995) 1.
- [78] N.S. Brown, R. Bicknell, Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer, *Breast Cancer Res.* 3 (2001) 323–327.
- [79] K. Senthil, S. Aranganathan, N. Nalini, Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients, *Clin. Chim. Acta.* 339 (2004) 27–32.
- [80] W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function., *Physiol. Rev.* 82 (2002) 47–95.
- [81] Y. Sun, Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis, *Free Radic. Biol. Med.* 8 (1990) 583–599.
- [82] M. Samir, Thiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer., *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 24 (1999) 232–234.
- [83] P.A. Maldonado, L.A. Negrini, R.R. Kaizer, R.F. Zanin, M.D.C. Araújo, V. Battisti, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia, *Clin. Chim. Acta.* 366 (2006) 174–178.
- [84] V. Battisti, L.D.K. Maders, M.D. Bagatini, L.G.B. Reetz, J. Chiesa, I.E. Battisti, J.F. Gonçalves, M.M.F. Duarte, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis, *Biomed. Pharmacother.* 65 (2011) 516–524.
- [85] A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *Eur. J. Med. Chem.* 97 (2015) 55–74.
- [86] M. Gerić, A.M. Domijan, V. Gluščić, R. Janušić, B. Šarčević, V. Garaj-Vrhovac, Cytogenetic status and oxidative stress parameters in patients with thyroid diseases, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 810 (2016) 22–29.
- [87] M. Syed, C. Fenoglio-Preiser, K.A. Skau, G.F. Weber, Acetylcholinesterase supports anchorage independence in colon cancer., *Clin. Exp. Metastasis.* 25 (2008) 787–798.
- [88] K. Prabhu, D. Naik, S. Ray, Vadiraj, A. Rao, A. Kamath, Significance of serum butyrylcholinesterase levels in oral cancer, *Australas. Med. J.* 4 (2011) 374–378.
- [89] M. Barbosa, O. Rios, M. Velásquez, J. Villalobos, J. Ehrmanns, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors, *Surg. Neurol.* 55 (2001) 106–112.
- [90] A. Robitzki, A. Mack, U. Hoppe, A. Chatonnet, P.G. Layer, Butyrylcholinesterase antisense transfection increases apoptosis in differentiating retinal reagggregates of the chick embryo., *J. Neurochem.* 71 (1998) p413.

**Table 1**

General characteristics of patients with Thyroid Cancer and Controls.

	<b>Thyroid Cancer (n=19)</b>	<b>Controls (n=25)</b>
Age (y) <sup>a</sup>	45,26 ± 16,09	30,84 ± 9,582
Gender (Female/male)	14/5	24/1
Nodule size <sup>a</sup>	2,436 ± 1,150	-
Papillary carcinoma	14	-
Follicular carcinoma	5	-
Presence of metastasis	5	-

<sup>a</sup> Continuous variables are presents as means ± SD.

## Legends

**Fig. 1** E-NTPDase activity in the hydrolysis of ATP (A) and ADP (B) in platelets of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. \*\* P and \*\*\* P <0.05, n = 18-25 (A) and n = 17-25 (B). Activity of E-5'-NT (C) in platelets of patients with thyroid cancer and control group. \* P <0.05, n = 14-19. Specific enzymatic activities were reported as nmol of released Pi/min/mg protein. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.

**Fig. 2** E-ADA activity in platelets (A) and serum (B) of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. \* P <0.05, n = 19-19 (A) and n = 15-12 (B). Enzyme activities were reported as U ADA/mg protein and U/L, respectively. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.

**Fig. 3** ERO levels (A) in serum of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. \* P <0.05, n = 14-10. The results were expressed as DCFH-DA fluorescence. Levels of TBARS (B) in the serum of patients with thyroid cancer and control group. \* P <0.05, n = 10-11. Serum TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein. Levels of carbonylated proteins (C) in the serum of patients with thyroid cancer and control group. n = 13-10. The results were expressed as nmol carbonyl/mg total protein. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.

**Fig. 4** Levels T-SHs (A) and GSH (B) in the serum of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. n = 12-9 and n = 13-12, respectively. The thiol group content in the samples was expressed as nmol of T-SH/mg protein and that of GSH as nmol of GSH/ml of serum. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.

**Fig. 5** BChE activity in the serum of patients with thyroid cancer (Ca Thyroid) and control group. \* P <0.05, n = 14-10. The enzymatic activity was expressed in  $\mu$ mol of BcSCh/h/mg of protein. The variables were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's t-test for independent samples was used for the analyzes.

Fig. 1

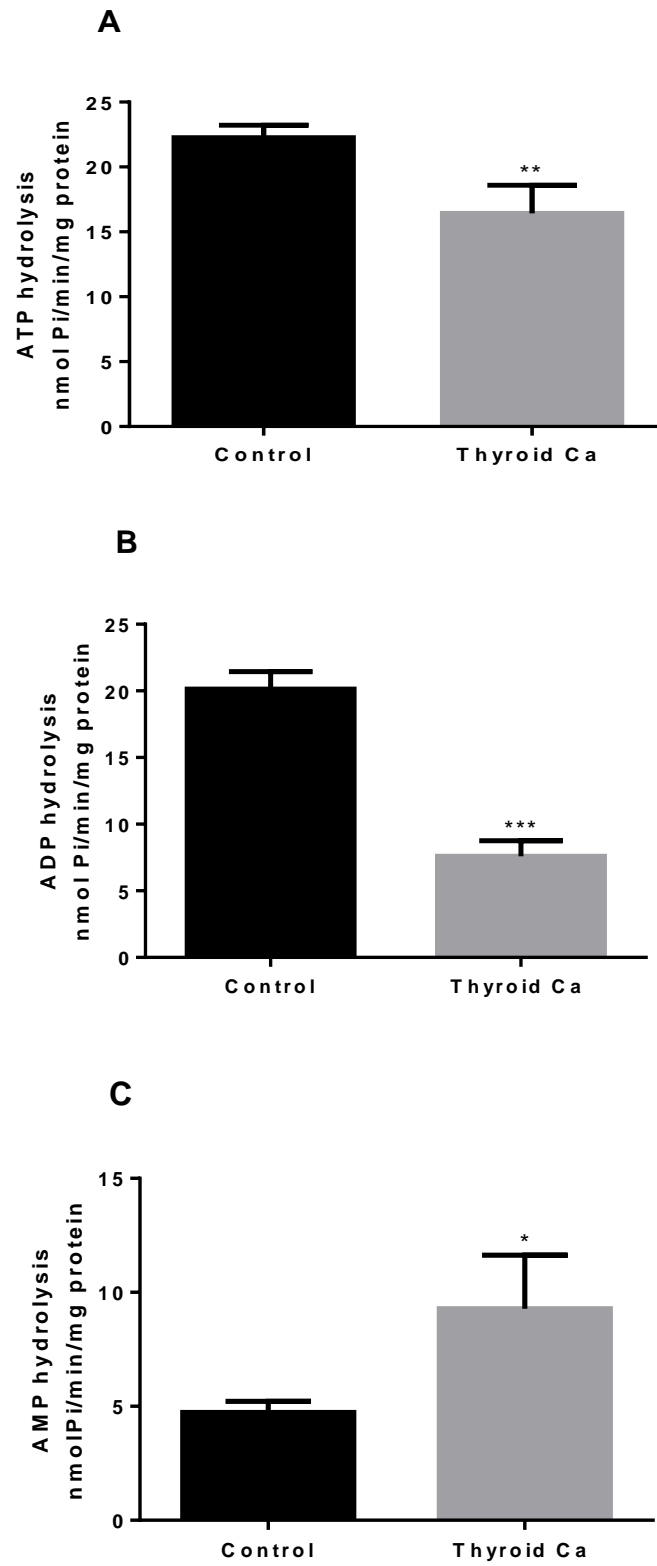


Fig. 2

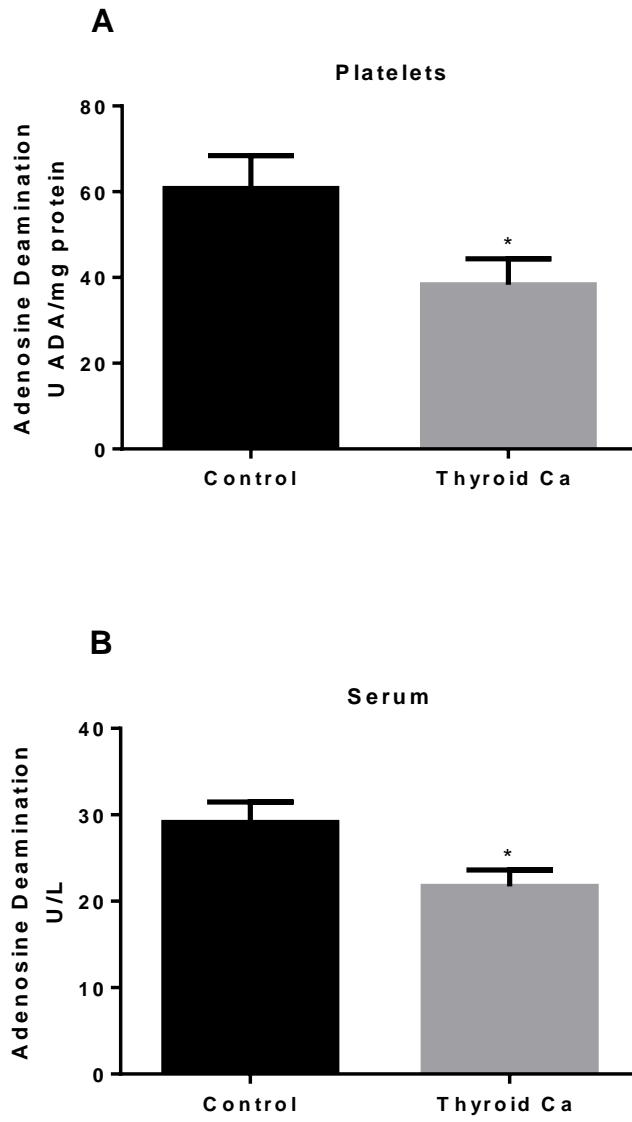
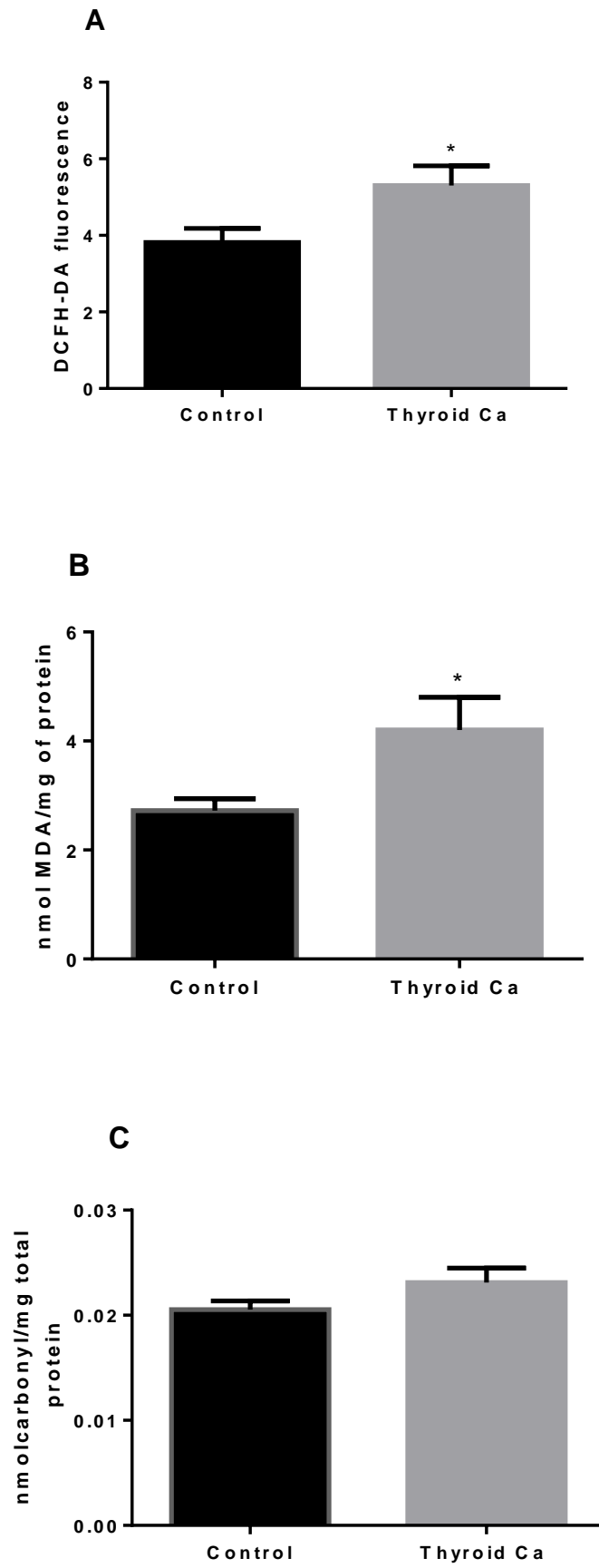


Fig. 3



**Fig. 4**

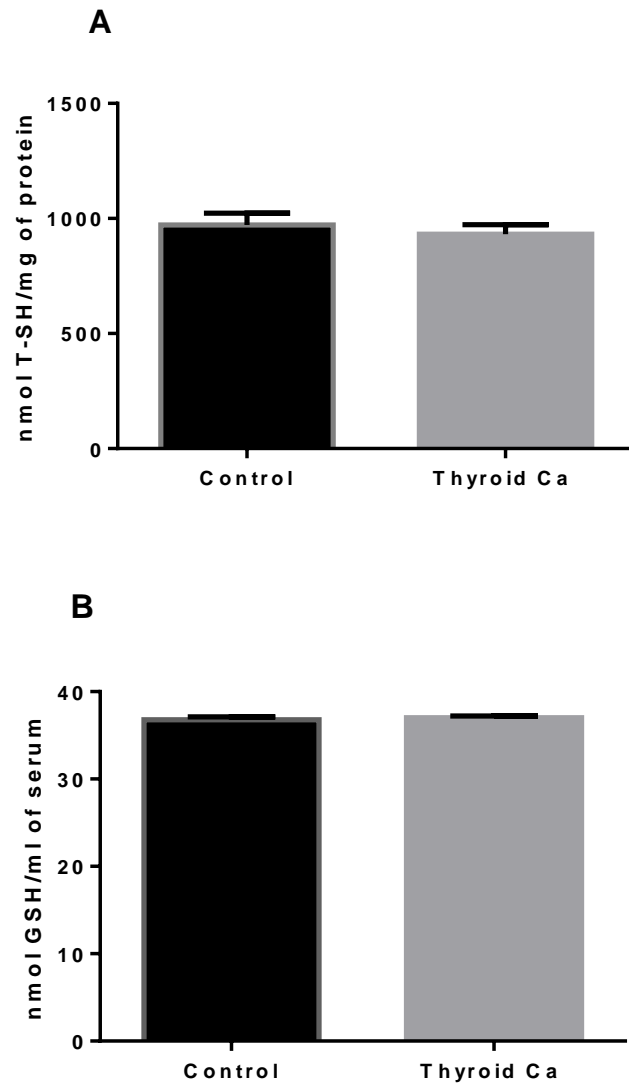
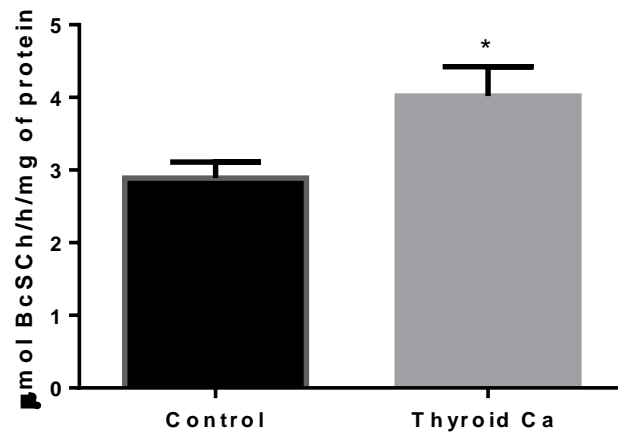


Fig. 5





## 4.2 Manuscrito II

### **THE INVOLVEMENT OF PURINERGIC SIGNALING IN THYROID CANCER AND ITS ROLE AS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET**

Patrícia Bernardes Cavalheiro<sup>1</sup>, Viviane Martins Bernardes<sup>1</sup>, Daniela Ferreira Passos<sup>1</sup>, Paulo Guilherme Schimittes<sup>1</sup>, Daniela Bitencourt Rosa Leal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima n° 1000, Building 20, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Correspondence to Daniela Bitencourt Rosa Leal

Tel: (55) 3220 9581

e-mail: [dbitencourtrosaleal@gmail.com](mailto:dbitencourtrosaleal@gmail.com)

[ORCID: 0000-0003-2618-9801](https://orcid.org/0000-0003-2618-9801)

**ABSTRACT**

Thyroid cancer is an endocrine malignancy whose global incidence has increased rapidly over the last decades. Although most cases of thyroid cancer have a good survival rate, a subset of cases demonstrates resistance to conventional treatment and high rates of recurrence and metastasis. Recently, many studies have reported the role of extracellular nucleotides such as adenosine 5'-triphosphate (ATP), and nucleosides, such as adenosine, as important modulators in the tumor microenvironment. Given the global increase in the incidence of thyroid cancer and evidence of the involvement of purinergic signaling in tumor, we will discuss the role of the purinergic signaling in cancer and thyroid cancer and its potential as a therapeutic target for cancer. We have searched electronic databases for papers on the subject. We found many in vitro and in vivo studies that demonstrated the participation of ectonucleotidases, purinergic receptors and adenosine in tumor growth and progression, as well as clinical studies using the enzyme ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT/CD73) and ATP and adenosine receptor blockers as antitumor agents. The recognition of the involvement of purinergic signaling in cancer and, hence, the transformation of its components into therapeutic targets for the different types of tumors is of fundamental importance, especially for aggressive thyroid cancer, which is resistant to the different currently available treatments.

Keywords: thyroid cancer, purinergic signaling, ATP, CD39, CD73, adenosine

## INTRODUCTION

### *Thyroid cancer: epidemiology, classification, and carcinogenesis*

Thyroid cancer is the most prevalent cancer affecting the endocrine glands and is among the top five most frequent cancers in women [1]. The incidence of thyroid cancer (TC) has increased steadily over the past three decades in many countries and regions of the world [2]. In Brazil, according to the National Cancer Institute (INCA) [3], the estimate of new cases of thyroid cancer for each year of the 2018-2019 biennium is of 1,570 new cases in males and 8,040 in females, with an estimated risk of 1.49 cases for every 100,000 men and 7.57 cases by 100,000 women.

The increased incidence of this type of cancer clearly coincided with the great increase in the use and sensitivity of diagnostic techniques for thyroid gland evaluation [4]. Until the late 1970s, most cases of thyroid cancer were diagnosed in patients who had nodules that caused symptoms of compression or visible cervical masses, and only relatively large nodules were assessed by palpation and biopsy. The advent of ultrasonography of the neck and thin-needle biopsy guided by ultrasound in the late 1980s allowed the detection and histological examination of nodules as small as a few millimeters [4].

Thyroid carcinomas are classified according to histopathological criteria into: differentiated (papillary and follicular), undifferentiated (anaplastic) and medullary, the most frequent being papillary carcinomas, followed by follicular carcinomas [5] (**Fig. 1**). Among these neoplasms, the prognosis is generally good for patients with adequately treated differentiated thyroid cancer. However, anaplastic (undifferentiated) thyroid carcinomas do not exhibit such evolutionary behavior and exhibit high lethality [6]. During tumor progression, the process of dedifferentiation can occur in as much as 5% of tumors. Generally, following this process, we observe a more aggressive development of the tumor, metastatic dissemination, and loss of iodine uptake. All these events contribute to the development of resistance to the available therapeutic treatments [7].

Thyroid stimulating hormone (TSH) is the major regulator of thyroid growth and function. Excess TSH is a predisposing factor for thyroid cancer [8]. The presence of receptors for estrogen in neoplastic thyroid cells and the higher frequency in females suggests the participation of female sex hormones in the genesis of this neoplasm [9]. It is hypothesized that in hormonal carcinogenesis, differently from that induced by viruses or chemical agents, cell proliferation does not require a specific initiating agent. Hormones induce cellular proliferation with consequent genetic mutations that will generate the neoplastic cell [8]. However, for

Carreño et al. [10], the participation of hormones in carcinogenesis is restricted to the proliferation of cells that have already been transformed by other carcinogens.

### ***Purinergic system and its involvement in cancer***

Thyroid disorders are characterized not only by genetic alterations but also by inflammatory responses produced by cellular damage or necrosis. The purinergic system, which consists of enzymes, nucleotides, adenine nucleosides and purinergic receptors, participates in many different cellular responses. Upregulation or downregulation of the ability to proliferate, differentiate, migrate, release mediators and die are among the effects of the purinergic system on immune cells. [11].

Purinergic signaling, in which adenosine 5'-triphosphate (ATP) and adenosine work as extracellular signaling molecules, was first proposed in 1972 [12]. Subsequently, the purine and pyrimidine receptors were cloned and functionally characterized [13]. Adenosine interacts with four P1 receptor subtypes (A1, A2A, A2B). Seven subtypes of P2 receptors linked to ionic channels (P2X1-P2X7), while another eight P2 receptors are attached to the G protein P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11- P2Y14), were identified and interact with ATP [14]. Most non-neuronal cells as well as by neurons express these receptors [15]. Nucleotide-mediated signaling is controlled by a highly efficient enzymatic cascade including members of the family ectonucleoside triphosphate 5'-diphosphohydrolase (E-NTPDase/CD39), ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP), ecto-5'-nucleotidase/CD73 (E-5'-NT/CD73), and alkaline phosphatases [16].

Both ATP and adenosine directly affect the growth of tumor cells. ATP is a pro-inflammatory, immunostimulatory, and growth-promoting agent. Adenosine is a powerful immunosuppressant and a cellular growth modulator. This complex signaling network produces a series of inhibitory and stimulatory effects on immune cell function, tumor progress, and metastatic spread [17]. Changes in E-NTPDase activities have been demonstrated under different pathological conditions. For example, altered expression of this enzyme has been described in pancreas and breast tumor cells [18,19]. Furthermore, the involvement of CD73 in drug resistance and tumor-promoting functions has been suggested [20].

The importance of purinergic signaling, both in normal physiology and pathological conditions, has been progressively recognized in recent decades. Many studies have demonstrated the involvement of the purinergic system in the most varied types of tumors [21–25]. Furthermore, numerous *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated vigorous participation of ectonucleotidases in tumor growth and progression. In view of the increasing

number of cases of thyroid cancer in several parts of the world and the relevance of the involvement of purinergic signaling in the development of tumors, in this paper, we review the literature and discuss the role of the purinergic system in thyroid cancer.

## **PURINERGIC SIGNALING, CANCER AND THYROID CANCER**

Initially, purines were believed to be restricted to the intracellular compartment, where they participate in a multiplicity of biochemical reactions. However, at the present time adenosine and ATP are known to be abundant components of the tumor microenvironment and potent modulators of immune cell responses and cytokines release, as well as being important mediators of host-tumor interaction. Therefore, both ATP and adenosine directly affect the growth of tumor cells [17].

The catabolism of ATP is a well-regulated process because of its crucial roles in cell metabolism and signaling. Adenosine monophosphate (AMP) is generated by the catabolism of ATP with intermediate adenosine diphosphate (ADP) formation and its subsequent conversion to adenosine. These reactions are performed by ectoenzymes of the NTPDase family (eight have been identified in humans) and non-specific tissue alkaline phosphatases. Conversion of ATP to AMP is predominantly catalyzed by CD39 (NTPDase) with only traces of ADP being released [26], whereas CD73 converts AMP to adenosine (**Fig. 2**). Thus, CD39 and CD73 act together to convert ATP, an immunostimulatory molecule, to immunosuppressive adenosine [27]. Nucleotides and nucleosides can be recognized by purinergic receptors, regulating pathophysiological functions in various tissues [28]. The purinergic system modulates tissue and cell processes ranging from physiological conditions such as the maintenance of homeostasis, cicatrization, and immune responses to pathological conditions such as neurological diseases and cancer [29].

### ***The role of ATP and its receptors in cancer***

Within the tumor microenvironment, ATP and adenosine accumulation acting as danger signals and pro-inflammatory mediators. Malignant tumors are known to trigger a strong inflammatory response and are often characterized by the formation of diffuse necrotic foci. Under these conditions, the increase in the levels of ATP in the extracellular space is a result of its extravasation from injured cells, owing to membrane injury or efflux through specific channels [17].

However, recent findings show that the release of ATP is not only a consequence of damage to the tumor or host cells or a byproduct of inflammatory activation of cells but also a process closely involved in the metabolism of cancer cells and in antitumor immunity [30]. In a study of papillary thyroid cancer cells, it was shown that cancer cells had an intracellular and extracellular concentration of ATP at least 3-fold higher than control cell concentrations [31].

In healthy tissues, the levels of extracellular ATP are usually very low; however, in inflamed and injured tissues, as well as in the tumor microenvironment and site of metastasis, the extracellular ATP levels may be as high as a few hundred  $\mu\text{mol}$  per liter [32]. Whether the extracellular accumulation of ATP will be beneficial or detrimental to the host will depend on its concentration, the degree of adenosine hydrolysis, and the subtypes of P2 receptors expressed by the tumor and the infiltration of inflammatory cells [17].

P2 receptors are expressed in nearly all tumor cell lines investigated to date, as well as in many primary tumors, making them sensitive to ATP [15]. The P2Y1 and P2Y2 receptors stimulate tumor growth, so it is presumptive that increasing the ATP content in the tumor microenvironment can boost the proliferation of cancer cells through these receptors [33]. In addition, P2Y receptors may also facilitate invasiveness and metastatic dissemination by encouraging migration, as seen in prostate and breast cancer [34]. However, apoptosis has also been described as a result of the activation of P2Y1 or P2Y2 in a study with human colon carcinoma [35].

In addition to P2Y receptors, the P2X7 receptor is also involved in tumor growth. It has long been known that most malignant tumors overexpress P2X7 [36]. This fact is somewhat surprising since this receptor is known to mediate a strong cytotoxic response to the cell [37]. However, cytotoxicity is most commonly triggered by pharmacological doses of ATP (i.e., almost millimolar). In contrast, the activation of P2X7 by endogenously produced ATP exert a trophic effect, promoting growth [38]. Consequently, tumors that overexpress P2X7 show an accelerated rate of growth *in vivo*, a thicker vascular network and a greater tendency to metastasize [39]. The increase in the metastatic activity of cells expressing P2X7 is particularly relevant in the context of the oncogenic activity of this receptor. On the other hand, the silencing of P2X7 or its pharmacological blockade slows tumor progression [39].

Recent studies point to the involvement of the P2X7 receptor in cancer, suggesting that P2X7 overexpression may be a poor prognostic marker in malignancies as neuroblastoma [21] and papillary thyroid carcinoma [40]. Solini et al. [31] have shown that, in papillary thyroid cancer cells, P2X7 receptor expression is higher than in normal thyroid tissue cells. In addition, the authors also reported that, in papillary thyroid cancer cells, the activation of P2X7 receptors

induces the release of IL-6. IL-6 is involved in the pathogenesis of malignancies and its local expression correlates with the degree of aggressiveness in papillary and medullary thyroid cancers [41]. Gu et al. [42] evaluated X-linked apoptosis inhibitor (XIAP) and P2X7 receptor expression in tissue samples from papillary thyroid carcinomas and benign nodular goiter. They demonstrated an increased expression of XIAP and P2X7 receptors in thyroid carcinoma samples. The authors also observed an association between high levels of XIAP and P2X7 expression with the occurrence of lymph node metastasis and suggested that XIAP and P2X7 receptor expression may predict tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma.

Infiltrating inflammatory and tumor cells release ATP, which may play an essential part in the therapeutic efficacy of anticancer agents. Some therapies, such as mitoxantrone and oxaliplatin, owe their anticancer effect to the ability to trigger a strong antitumor immune response [43]. Recent data show that the increase in antitumor immunity induced by chemotherapy is largely mediated by the release of ATP from tumor cells [30,44]. Thus, sensitivity to chemotherapy may depend on the ability of different tumors to release ATP [17].

### ***The role of adenosine and its receptors in cancer***

In the tumor microenvironment, adenosine is found in high quantities [45] and has been implicated in tumor-associated immunosuppression [17]. The conversion of extracellular ATP to adenosine, essentially through the enzymatic activity of membrane-bound CD39 and CD73 nucleotidases, acts as a negative feedback mechanism that prevents excessive immune reactions. The extracellular adenosine activates four distinct receptors coupled to the G protein, A1, A2A, A2B and A3 [46], and is degraded to inosine by adenosine deaminase [29].

Hypoxia increases the expression of CD39 [47] and CD73 [48] thereby promoting the breakdown of extracellular ATP into adenosine. Hypoxia also showed a positive upregulation of A2A [49] and A2B [50] receptors, thus increasing the cellular responsiveness to adenosine. Therefore, these data indicate that the hypoxic tumor microenvironment is well-equipped to convert pro-inflammatory ATP to adenosine and respond to the immunosuppressive effects of adenosine [23].

Adenosine-mediated immunosuppression is a critical physiological mechanism to protect tissues against excessive inflammation and promote tissue repair after injury. In the tumor microenvironment, this process is hijacked and exploited to decrease antitumor, immunity, and promote cancer progression [40]. A group of researchers [51] demonstrated that immune cells responses to tumor are impaired by adenosine coming from tumor CD73 at multiple levels, including the functions of cytotoxic T lymphocytes. Thus, genetic ablation or

therapeutic inhibition of CD73 or A2A improves the effector functions of cytotoxic lymphocytes and significantly reduces tumor growth [24,45,52]. These findings correlate well with the clinical observations reported in patients with high-grade serous ovarian cancer, where the prognostic value of infiltrating CD8+ T cells counts was improved when tumors had a low CD73 expression [22].

Blay and Hoskin [53,54], who first described that adenosine was responsible for the immunosuppression in the tumor environment, measured adenosine levels in the interstitial fluid of solid tumors and showed the inhibition of tumor-infiltrating cytotoxic T cells by adenosine. More recent studies have highlighted the crucial role of extracellular adenosine-generating systems in tumor progression [17]. Adenosine affects host and tumor responses. On the host perspective, adenosine is well-known for its strong immunosuppressive/anti-inflammatory activity [55]. The effect of adenosine on tumors is still not entirely clear and depends on the expression of the specific adenosine receptors by tumor cells. Depending on which receptor is expressed, tumors can be either stimulated and inhibited [56].

Each of the receptors exhibits different affinities for adenosine. A1, A2A, and A3 respond to low levels of adenosine (250-700 nM) and are classified as high affinity adenosine receptors. On the other hand, activation of the A2B low affinity receptor occurs only in pathological conditions, such as in the tumor microenvironment, where adenosine accumulates at high concentrations (25  $\mu$ M) [57]. Adenosine receptors are also subdivided based on their ability to induce the intracellular cyclic AMP signaling molecule (cAMP). Signaling via cAMP (as seen with A2A and A2B) is typically associated with profound immunosuppression [45], while activation of A1 and A3 inhibits cAMP generation [58,59].

The detrimental and beneficial effects of A1 receptor activation have been reported. A1 receptors may favor the growth of breast cancer cells and the chemotaxis of melanoma cells [56,60], but in advanced prostate cancer this receptor is expressed at low levels [61]. There is a limited understanding of the influence of A2A on tumor cell function. A recent study found that high A2A expression in patients with adenocarcinoma was positively correlated with relapse-free survival [25], while in other studies A2A expression in human melanoma and breast cancer was associated with increased survival and proliferation of cancer cells [62,63].

Overexpression of A2B receptor was associated with lower survival in patients with triple negative breast cancer (TNBC), multiple myeloma, acute myeloid leukemia (AML), and liposarcoma [64]. Blockade of A2B in TNBC reduced pulmonary metastasis and directly hampered cell proliferation, survival, and invasion [64].



The role of the A3 receptor in cancer has also been investigated, however contrasting results were reported. A3 stimulation inhibits the proliferation of prostate carcinoma, colon carcinoma, and pancreatic carcinoma, but promotes the proliferation of colon cancer cells [56]. Morello et al. [65] performed a detailed analysis of adenosine A3 receptor expression in cells from human normal thyroid samples, as well as in primary thyroid cancer tissues and in papillary, follicular and anaplastic thyroid carcinoma tissues using immunohistochemical analysis with anti-adenosine A3 receptor. Their results were negative for A3 receptor in normal thyroid cells, while all the other analyzed carcinomas expressed this receptor.

### ***The role of ectonucleotidases in cancer***

In recent years, some studies have demonstrated the role of purinergic signaling in cancer, including the cascade of enzymes responsible for its modulation in the tumorigenesis of different tumors [66–68]. Recent evidence suggests that both CD39 and CD73 have multiple and dynamic roles in tumor progression. These roles are not restricted to enzymatic activity but may be extended to other cellular functions such as tumor cell adhesion, migration, receptor internalization, and recycling [69].

The CD39/CD73 pathway is the most important to produce extracellular adenosine both in healthy or tumoral tissues [29]. The production of adenosine via CD39/CD73 has become apparent as a critical immunoregulatory mechanism, through the modulation of extracellular ATP and adenosine levels within the tumor microenvironment. CD39 and CD73 ectonucleotidases hydrolyze ATP and AMP, respectively, to produce adenosine. Characterized by its immunosuppressive action, adenosine interacts with its receptors and downregulates T and natural killer (NK) cells function. CD73 has shown to be expressed by several distinct cell types, including tumoral, endothelial and stromal cells [27,70].

The main source of CD39 in neoplastic tissues are regulatory T cells (Tregs) [71]. The number of CD39+ Tregs, which participate in the immunosuppression by generating adenosine, is increased in human cancers [72,73]. CD39 promotes the growth of colon cancer and metastasis in mice [74,75], and rupture or blockage of CD39 facilitates NK cell-mediated tumor eradication *in vivo* [75]. Besides Tregs, other cell types also express CD39 in the tumor environment and may stimulate tumor progression [68].

In addition, results from a recent study suggest that, like CD73, CD39 is also expressed by tumor cells [76]. Hausler et al. [76] described the expression of CD39 and production of adenosine by two ovarian cancer cell lines. Bastid et al. [68] demonstrated the expression of CD39 directly on the cell surface of various human cancer cell lines using flow cytometry with

an appropriate anti-CD39 monoclonal antibody. CD39 was strongly expressed on the surface of B lymphoma, melanoma, B cell chronic lymphocytic leukemia, and ovarian cancer cell lines. In that same study, using a large cohort of normal human and cancer tissues, CD39 was absent or weakly expressed in normal cells, except endothelial cells, whereas in some types of cancer, including thyroid cancer, CD39 was strongly expressed by tumor cells.

Extracellular ATP has an essential role in the immune response to tumors. In addition to its ability to lower the levels of immune-activating ATP, the sequential activity of CD39 and CD73 generates the immunosuppressive factor adenosine. Adenosine binds to receptors expressed by effector immune cells and induces the reduction of NK and CD8<sup>+</sup> T cells as well as the proliferation of the latest [11] (**Fig. 3**). CD39 regulates the extracellular levels of ATP and adenosine, modulating the immune response to tumors and immunogenic cell death. [68].

CD73 has been reported to participate in cell-cell and cell-matrix interactions and implicated the involvement of CD73 in the promotion of tumors and their resistance to drugs. CD73 has shown to be highly expressed in several human carcinomas, including colon, lung, pancreas, and ovary [20]. However, in a study using flow cytometry, CD73 was widely expressed and upregulated in several tumor cells types and tissues [70]. Kondo et al. [77] demonstrated an overexpression and increased CD73 activity in papillary thyroid carcinoma follicular cells, and low expression and activity of this enzyme in follicular cells of normal thyroid, nodular goiter, and follicular adenoma. Clinically, the increased expression of CD73 in papillary thyroid carcinomas could aid in the differential diagnosis of thyroid tumors. In this work, the authors further suggest that the increase of extracellular adenosine, generated by the high activity of CD73 in papillary carcinoma, may be related to neoplastic transformation.

Tumor neovascularization is associated with increased is CD73 expression, as well as invasiveness and metastasis, and with reduced survival in patients with breast cancer. Found in cell lines of highly invasive human melanoma, CD73 was positively expressed, however, it was not observed in melanocytes or primary tumor cells. CD73 has been implicated as a key player in the control of tumor advancement since it is a proliferative factor, which stimulates the growth of glioma cells [20]. In addition to its catalytic activity, CD73 is involved in the adhesion function, promoting tumor invasiveness, and in the development of cancer [66]. Bavaresco et al. [66] demonstrated the possible involvement of CD73 in the processes of invasiveness and aggressiveness of malignant gliomas. Stella et al. [67] demonstrated that, as in other tumor cells, CD73 is likely to be involved in the malignant transformation of bladder cancer.

Deletion of CD39 or CD73 results in improved antitumor immunity and increased survival [52,74]. The expression of ectoenzymes that catalyze the production of adenosine

seems to be critical in hematopoietic tissues as well as in non-hematopoietic tissues [52], which is likely due to CD73 participation in neovascularization and may increase the migration and metastatic spread of tumor cells by a mechanism independent of immune responses. An expressive study, which analyzed more than 6000 samples of triple negative breast cancer, showed that overexpression of CD73 and overactivation of A2A and A2B receptors significantly made the tumor resistant to chemotherapy [78]. Direct blocking of CD39 or CD73 with small inhibitory molecules or specific monoclonal antibodies produced very promising results [52,79].

## **THERAPEUTIC STRATEGIES FOR CANCER TREATMENT**

Several therapeutic alternatives have been used in patients with progressive thyroid cancer; however, conventional chemotherapy is ineffective in most cases [80]. Thyroid carcinomas are very resistant to chemotherapeutic agents [81]. In this scenery, the need for a better understanding of the molecular events involved in the progression of thyroid cancer becomes evident, aiming at the identification of new therapeutic targets with consequent improvement in the prognosis of patients with high-risk thyroid carcinomas.

The development of new combined therapies depends on the identification of different, and somewhat independent, targets. Current cancer therapies, especially radiotherapy and chemotherapy, are founded upon direct toxic effects on cancer cells, which, unfortunately, also affect host tissues [29]. An approach to a cancer cure should be based on multiple receptors and pathway targeting. Clinical evidence points to the exploration of physiological mechanisms for the efficient elimination of cancer cells such as immunochemotherapy. Purinergic signaling is a crucial ubiquitous path responsible for paracrine signaling in physiological processes and, especially, in pathological processes. The expression of distinct P1 and P2 receptors subtypes by different cells and the physiopathological changes in the concentration of adenosine and ATP, offer enormous plasticity to purinergic signaling [15].

The measurement of extracellular ATP levels was made possible due to the advances in biotechnology and showed that ATP reaches micromolar concentrations at sites of inflammation or tumor [32,82]. However, elevated levels of ATP in the tumor microenvironment are not always detrimental to the patient but may be beneficial as it stimulates the host antitumor response [29]. By associating with its respective P2 purinergic receptors, ATP can trigger a form of cancer cell death called immunogenic cell death [83].

During immunogenic cell death, the release of various immunostimulants (including ATP) boosts the recruitment, maturation, and function of immune cells [84].

The maintenance of an adequate immune response against cancer, as well as the efficacy of cancer therapy, has been shown to depend on an increased concentration of ATP on the cell surroundings [85]. This notion has given rise to the possibility that ATP could be used as therapy for both the primary tumor and its underlying systemic effects in patients with advanced disease, as shown *in vivo* using murine models. This could deeply impact the management of patients in the late stages of malignancy [15]. Agteresch et al. [86] found that intravenous infusions of ATP were beneficial to cachectic patients with advanced lung cancer a 6-month investigation period regarding body weight, muscle strength, and serum albumin levels. Subsequently, the same research group [87] demonstrated from a randomized controlled trial that infusions of ATP significantly increased overall survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. These results are important as they indicate the use of ATP as an adjuvant treatment for primary and secondary effects of malignancies, highlighting the importance of further trials to support the therapeutical use of ATP in cancer.

The elevated levels of ATP in the tumor microenvironment also have direct effects on tumor cells. In general, pharmacological doses of ATP are toxic to most cells expressing the P2X7 receptor [88]. On the other hand, ATP can directly stimulate the growth of tumor cells acting on P2Y receptors, as well as on P2X7 [15,39]. All evidence suggests that interaction with P2X7 is determinant for the effects of ATP during host-tumor interaction [29]. P2X7 receptor can make tumors more sensitive to ATP cytotoxicity; however, it may also induce the growth of tumor cells. Malignant tumors extensively express P2X7 and, consequently, blockade or pharmacological silencing of this receptor has a striking antitumor effect *in vivo* [21,39]. The results of *in vivo* studies with transplanted tumor models show that P2X7 blockade is generally beneficial [29]. P2X7 blockade may also be a viable therapeutic option considering the involvement of this receptor in the release of immunosuppressive factors from myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) [89]. Overexpression of P2X7 in MDSCs activates the release expression and/or expression of factors that associated with immunosuppression such as arginase, IL10, and transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) [89]. P2X7 blockade in MDSCs may help to alleviate immunosuppression in the tumor microenvironment and thus restore an efficient antitumor response. In any case, a therapy targeting P2X7 receptors will only be effective against P2X7-expressing tumors, as shown by preclinical data in which the blockade P2X7 has limited efficacy against tumors that show little or absent P2X7 expression [39].

It has become increasingly evident that antitumor immune responses are essential not only for the endogenous control of tumorigenesis but also for the therapeutic activity of standard treatments, such as chemotherapy. However, several regulatory mechanisms, or "immunological checkpoints", limit the generation of immune responses against cancer cells [90]. Currently, the extracellular CD39/ CD73/adenosine pathway in tumor cells is known to regulate antitumor immunity. Deaglio et al. [51] has shown that CD39/CD73- derived adenosine in tumor cells impairs several processes during the immune response including activation, clonal expansion, survival, and specific antitumor function of T cells. This result suggests an "autonomous" role of CD73 and adenosine in mechanisms of tumor cell evasion by inhibiting T cell antitumor action. Thus, the blockade of the tumoral CD73 enzymatic activity seems to be a therapeutic strategy for patients with cancer. In fact, due to adenosine's short half-life (<10 seconds), it is impossible to directly block it *in vivo* to preserve normal tissue functions [91].

Stagg et al. [79] investigated whether CD73 could be a potential target of antibody-based therapy. They demonstrated that anti-CD73 monoclonal antibody (mAb) therapy significantly delayed the growth of primary breast tumor in mice and significantly inhibited the development of spontaneous lung metastasis. The study also revealed that CD73-derived adenosine increased chemotaxis of tumor cells, suggesting the involvement of adenosine in the development of metastasis. The association of CD73 expression in breast cancer cells with increased migration has been previously demonstrated [92].

CD73 is a powerful suppressor of antitumor immune responses [27]. CD73-deficient mice show an improved antitumor immunity and resistance to experimental metastasis [52]. Jin et al. [70] observed that the combination of tumor CD73 blockade and tumor-specific T cell transfer cured all mice bearing ovary tumor. A study has found that the inactivation of CD73 in tumor cells increased the response of T cells to the tumor, including the activation and function of effector cells, fully restoring the efficacy of T cell therapy and provided long-term tumor-free survival. This has uncovered a tumor evasion mechanism mediated by CD73 and a new strategy for immunotherapy against cancer, targeting the tumoral CD73 enzymatic activity [90].

Treatment with anti-CD73 mAbs also has the potential to improve the response to chemotherapy. Treatment with drugs such as anthracyclines and oxaliplatin causes a release of ATP from tumor cells, which stimulates the immune system, resulting in immunogenic cell death [44,93]. Tumor cells expressing CD39 and CD73 have the potential to convert this ATP to adenosine, thereby reducing this effect of immune stimulation. In fact, CD73 expression is known to correlate with the resistance of cancer cell lines to chemotherapy, UV irradiation, and

death induced by the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [94]. CD73 blockade, therefore, represents an innovative approach with the potential to increase the efficacy of conventional and emerging therapies in the treatment of a broad spectrum of cancers [27].

The concomitant expression of CD39 and CD73 by tumor cells suggests that extracellular adenosine originated from ATP and ADP, is most likely generated by the CD39/CD73 pathway. The recruitment of antigen-presenting cells and the maturation of dendritic cells promoted by ATP in the tumor function as an important signal of immunological danger [44], consequently, the immune response to tumor could be considerably ameliorated by the inhibition of tumor CD39 [91].

A2A receptor blockade has been considered as a possible target for antitumor immunotherapy, which resembles other immunomodulatory approaches [95]. A2A receptor signaling is required for T cell homeostasis and control of tumor growth [96]. Ohta et al. [45] stated that the blockade of the adenosine A2A pathway is an immunotherapeutic strategy to avoid the suppression of antitumor T cells response. Young et al. [24] have explored the role played by CD73 and A2A within primary tumors and in the metastatic tumor microenvironment, identifying significant additive protection using the combination of an anti-CD73 mAb and an A2A inhibitor when compared to monotherapy. Similarly, double-knockout mice for A2A and CD73 showed significant reductions in the development of metastasis, primary tumor growth, and carcinogen-induced tumor initiation [83].

In antigen-presenting cells, A2B signaling suppresses antitumor adaptive immune responses. It has been suggested that immune cells that infiltrate the tumor can benefit tumor growth because of the high concentration of tumor adenosine and A2B receptors present in these cells, leading to the production of factors that stimulate neovascularization and repress immunity [97]. This hypothesis was confirmed when A2B receptor knockout mice exhibited significantly attenuated growth of Lewis lung carcinoma [98]. Blockade of A2B in triple negative breast cancer cells reduced lung metastasis and directly hampered cell proliferation, survival, and invasion [64].

## **FINAL CONSIDERATIONS**

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, the incidence of which has been increasing in recent years, mainly due to improvements in the diagnosis and understanding of molecular signaling pathways [99]. Although mortality from thyroid cancer is relatively low, the rate of relapse or persistence of the disease is high, which is associated with greater patient

incurability, morbidity, and mortality [100]. Thus, the need for the use of new biomarkers as well as the understanding of the molecular mechanisms involved in the initiation and progression of the malignant tumors of this gland is of great relevance for the development of more effective therapeutic strategies, with a consequent improvement in the prognosis of patients with thyroid cancer.

The importance of the participation of purinergic signaling, both in normal physiology and in pathological alterations, has been progressively recognized in the last decades. Furthermore, multiple *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated a strong involvement of ectonucleotidases, purinergic receptors, and adenosine in tumor growth and progression. We review the involvement of the components of the purinergic system in thyroid cancer and in different types of tumors. We highlight the strong expression of CD73 in a subtype of thyroid cancer with a consequent increase in adenosine production, which has a well-known immunosuppressive action and may be related to neoplastic transformation.

The resistance of aggressive thyroid cancer to the currently available treatments makes the identification of new therapeutic targets of utmost importance. The search for mechanisms involved in the immunosuppression associated with tumors has allowed the use of CD73, ATP blockers, and adenosine receptors in clinical trials. Here, we highlight the involvement of the purinergic signaling in tumor progression and the importance of this signaling pathway in the search for biomarkers and treatment targets.

## **FUNDING SOURCE**

None declared.

## **COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS**

### ***Conflict of interest***

The authors declare that they have no conflict of interest.

### ***Ethical approval***

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## REFERENCES

1. Yu YJ, Li N, Yun ZY, et al. Preoperative mean platelet volume and platelet distribution associated with thyroid cancer. *Neoplasma*. 2017;64:594–8.
2. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *Int J cancer*. 2015;136:2187–95.
3. Brasil MS. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. 2018. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Accessed 22 sep 2018.
4. Brito JP, Morris JC, Montori VM. Thyroid cancer: zealous imaging has increased detection and treatment of low risk tumours. *BMJ*. 2013;347:f4706.
5. Hegedüs L. The thyroid nodule. *N Engl J Med*. 2004;351:1764–71.
6. Graf H, Paz-Filho G. Recombinant human TSH use in differentiated thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51:806–12.
7. Coelho SM, Carvalho DP de, Vaisman M. New perspectives on the treatment of differentiated thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51:612–24.
8. Meuten DJ. Tumors in domestic animals. 4<sup>th</sup> ed. Iowa State Univ California; 2002.
9. Luotto R. Plasma-prolactin in human breast cancer. *Lancet*. 1997;433–4.
10. Carreño MSR, Peixoto S, Giglio A del. Reposição hormonal e câncer de mama. *Rev Soc Bras Canc*. 1999;7:41–50.
11. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:842–57.
12. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972;24:509–81.
13. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998;50:413–92.
14. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:1471–83.
15. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*. 2013;9:491–540.
16. Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res*. 2001;52:44–56.
17. Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res*. 2012;72:5441–7.
18. Kittel A, Garrido M, Varga G. Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas. *J Histochem Cytochem*. 2002;50:549–55.
19. Blánquez MJ, Arenas MI, Conde I, Tirado OM, Paniagua R, Notario V. Deregulated



- expression of the PCPH proto-oncogene in human breast cancers. *Int J Oncol.* 2004;25:821–30.
20. Spychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther.* 2000;87:161–73.
21. Amoroso F, Capece M, Rotondo A, et al. The P2X7 receptor is a key modulator of the PI3K/GSK3 $\beta$ /VEGF signaling network: evidence in experimental neuroblastoma. *Oncogene.* 2015;34:5240-51.
22. Turcotte M, Spring K, Pommey S, et al. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res.* 2015;75:4494–503.
23. Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;29:7–16.
24. Young A, Ngiow SF, Barkauskas DS, et al. Co-inhibition of CD73 and A2AR adenosine signaling improves anti-tumor immune responses. *Cancer Cell.* 2016;30:391–403.
25. Inoue Y, Yoshimura K, Kurabe N, et al. Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8:8738-51.
26. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal. Springer;* 2006;2:409-30.
27. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: A potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 2012;33:231–7.
28. White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27:211–7.
29. Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene.* 2017;36:293–303.
30. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ –dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009;15:1170-79.
31. Solini A, Cuccato S, Ferrari D, et al. Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: A new potential marker of the disease? *Endocrinology.* 2008;149:389–96.
32. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One.* 2008;3:e2599.
33. Xie R, Xu J, Wen G, et al. The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J Biol Chem.* 2014;289:19137–49.

34. Li WH, Qiu Y, Zhang HQ, et al. P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2013;109:1666-75.
35. Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung K-K, et al. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2005;288:G1024-35.
36. Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E. P2X 7: a growth-promoting receptor—implications for cancer. *Purinergic Signal*. 2009;5:251-6.
37. Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, al. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ*. 1998;5:191-9.
38. Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, et al. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J*. 2010;24:3393-404.
39. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res*. 2012;72:2957-69.
40. Kwon JH, Nam ES, Shin HS, Cho SJ, Park HR, Kwon MJ. P2X7 receptor expression in coexistence of papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis. *Korean J Pathol*. 2014;48:30-5.
41. Ruggeri RM, Villari D, Simone A, et al. Co-expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) in thyroid nodules is associated with co-expression of CD30 ligand/CD30 receptor. *J Endocrinol Invest*. 2002;25:959-66.
42. Gu L-Q, Li F-Y, Zhao L, et al. Association of XIAP and P2X 7 receptor expression with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine*. 2010;38:276-82.
43. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8:151-60.
44. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res*. 2010;70:855-8.
45. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:13132-7.
46. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*. 2004;25:33-9.
47. Eltzschig HK, Köhler D, Eckle T, Kong T, Robson SC, Colgan SP. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood*. 2009;113:224-32.
48. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*. 2002;110:993-1002.

49. Ahmad A, Ahmad S, Glover L, et al. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor is a unique angiogenic target of HIF-2 $\alpha$  in pulmonary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:10684–9.
50. Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK, Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A<sub>2B</sub> receptor in hypoxia. *FASEB J*. 2006;20:2242–50.
51. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204:1257–65.
52. Stagg J, Divisekera U, Duret H, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res*. 2011; 71:2892-900
53. Blay J, White TD, Hoskin DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res*. 1997;57:2602–5.
54. Hoskin DW, Butler JJ, Drapeau D, Haeryfar SMM, Blay J. Adenosine acts through an A<sub>3</sub> receptor to prevent the induction of murine anti-CD3-activated killer T cells. *Int J cancer*. 2002;99:386–95.
55. Linden J, Cekic C. Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2097–103.
56. Gessi S, Merighi S, Sacchetto V, Simioni C, Borea PA. Adenosine receptors and cancer. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*. 2011;1808:1400–12.
57. de Lera Ruiz M, Lim Y-H, Zheng J. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor as a drug discovery target. *J Med Chem*. 2013;57:3623–50.
58. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A<sub>1</sub> receptors and inhibited via adenosine A<sub>2</sub> receptors. *J Immunol*. 1992;148:2201–6.
59. Butler M, Sanmugalingam D, Burton VJ, et al. Impairment of adenosine A<sub>3</sub> receptor activity disrupts neutrophil migratory capacity and impacts innate immune function in vivo. *Eur J Immunol*. 2012;42:3358–68.
60. Lin Z, Yin P, Reierstad S, et al. Adenosine A<sub>1</sub> receptor, a target and regulator of estrogen receptor $\alpha$  action, mediates the proliferative effects of estradiol in breast cancer. *Oncogene*. 2010;29:1114-22.
61. Mousavi S, Panjehpour M, Izadpanahi MH, Aghaei M. Expression of adenosine receptor subclasses in malignant and adjacent normal human prostate tissues. *Prostate*. 2015;75:735–47.
62. Merighi S, Mirandola P, Milani D, et al. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. Elsevier; 2002;119:923–33.
63. Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J, Flament S. Crosstalk between adenosine receptor

- (A2A isoform) and ER $\alpha$  mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2009;21:977–81.
64. Mittal D, Sinha D, Barkauskas D, et al. Adenosine 2B receptor expression on cancer cells promotes metastasis. *Cancer Res.* 2016;76:4372-82.
65. Morello S, Petrella A, Festa M, et al. CI-IB-MECA inhibits human thyroid cancer cell proliferation independently of A3 adenosine receptor activation. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:278–84.
66. Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, et al. The role of ecto-5'nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem.* 2008;319:61–8.
67. Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, et al. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2010;28:260–7.
68. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, et al. Inhibition of CD39 Enzymatic Function at the Surface of Tumor Cells Alleviates Their Immunosuppressive Activity. *Cancer Immunol Res.* 2015;3:254–65.
69. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD 39 and CD 73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev.* 2017;276:121–44.
70. Jin D, Fan J, Wang L, et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: A novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res.* 2010;70:2245–55.
71. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene.* 2013;32:1743-51.
72. Mandapathil M, Szczepanski MJ, Szajnik M, et al. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin cancer Res.* 2009;15:6348–57.
73. Jie HB, Gildener-Leapman N, Li J, et al. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients. *Br J Cancer.* 2013;109:2629-35.
74. Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, et al. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. *Am J Pathol.* 2007;171:1395–404.
75. Sun X, Wu Y, Gao W, et al. CD39/ENTPD1 expression by CD4+ Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology.* 2010;139:1030–40.
76. Häusler SFM, del Barrio IM, Strohschein J, et al. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1405-18.

77. Kondo T, Nakazawa T, Murata SI, Katoh R. Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. *Histopathology*. 2006;48:612–4.
78. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:11091–6.
79. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107:1547–52.
80. Ward LS, Assumpção LVM. Câncer diferenciado da tiroide: fatores prognósticos e tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48:126-36.
81. Malaguarnera R, Vella V, Vigneri R, Frasca F. p53 family proteins in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14:43–60.
82. Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F. A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell*. 2005;16:3659–65.
83. Vijayan D, Young A, Teng MWL, Smyth MJ. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:709-24.
84. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:51–72.
85. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*. 2011;334:1573–7.
86. Agteresch HJ, Leij-Halfwerk S, Van Den Berg JWO, Hordijk-Luijk CH, Wilson JHP, Dagnelie PC. Effects of ATP infusion on glucose turnover and gluconeogenesis in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Sci*. 2000;98:689–95.
87. Agteresch HJ, van Rooijen MHC, van den Berg JWO, Minderman-Voortman GJ, Wilson JHP, Dagnelie PC. Growth inhibition of lung cancer cells by adenosine 5'-triphosphate. *Drug Dev Res*. 2003;60:196–203.
88. Di Virgilio F. P2X receptors and inflammation. *Curr Med Chem*. 2015;22:866–77.
89. Bianchi G, Vuerich M, Pellegatti P, et al. ATP/P2X7 axis modulates myeloid-derived suppressor cell functions in neuroblastoma microenvironment. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1135.
90. Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 2010;29:5346–58.
91. Zhang B. CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2010;70:6407–11.
92. Zhi X, Chen S, Zhou P, et al. RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clin Exp Metastasis*. 2007;24:439–48.

93. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* 2011;71:4809-20.
94. Mikhailov A, Sokolovskaya A, Yegutkin GG, et al. CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J Immunol.* 2008;181:464–75.
95. Waickman AT, Alme A, Senaldi L, Zarek PE, Horton M, Powell JD. Enhancement of tumor immunotherapy by deletion of the A<sub>2A</sub> adenosine receptor. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61:917–26.
96. Cekic C, Sag D, Linden J. Cell-intrinsic adenosine A<sub>2A</sub> receptor signaling is required for T cell homeostasis and control of tumor growth. *Am Assoc Immunol.* 2012;188:127-45.
97. Cekic C, Linden J. Adenosine A<sub>2B</sub> receptor signaling in antigen presenting cells suppress anti-tumor adaptive immune responses. *Am Assoc Immunol.* 2012;188.
98. Ryzhov S, Novitskiy SV, Carbone DP, et al. Host A<sub>2B</sub> adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia.* 2008;10:987–95.
99. Ito Y, Nikiforov YE, Schlumberger M, Vigneri R. Increasing incidence of thyroid cancer: controversies explored. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:178-84.
100. Tuttle RM, Ball DW, Byrd D, et al. Thyroid carcinoma. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2010;8:1228–74.

## Legends

**Fig. 1** Schematic representation of the origin and progression of thyroid carcinomas

**Fig. 2** Enzymatic cascade: the conversion of ATP to adenosine. The CD39 enzyme acts converting the ATP to the ADP intermediate and subsequently converts the ADP to AMP. AMP, in turn, is converted to adenosine by the action of the enzyme CD73

**Fig. 3** Immunosuppression induced by the conversion of ATP to adenosine in tumor cells and immunosuppressive cells subsets. Adenosine suppresses antitumor immunity by activating adenosine receptors in multiple subgroups of immune cells, including T lymphocytes and NK cells. In addition to the suppression of immunity, the activation of these receptors leads to the production of factors that promote tumor angiogenesis

Fig. 1

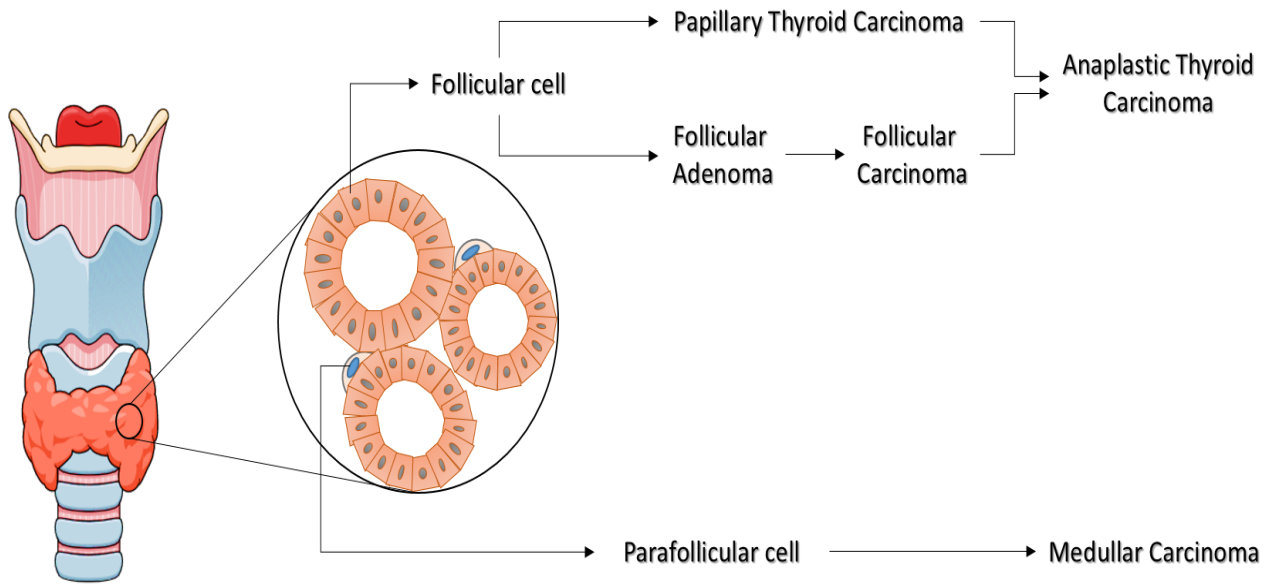




Fig 2

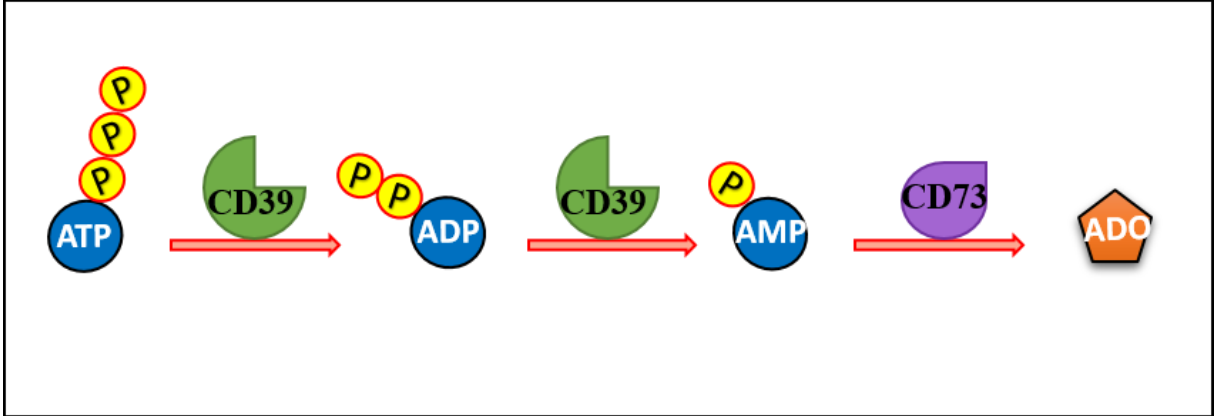
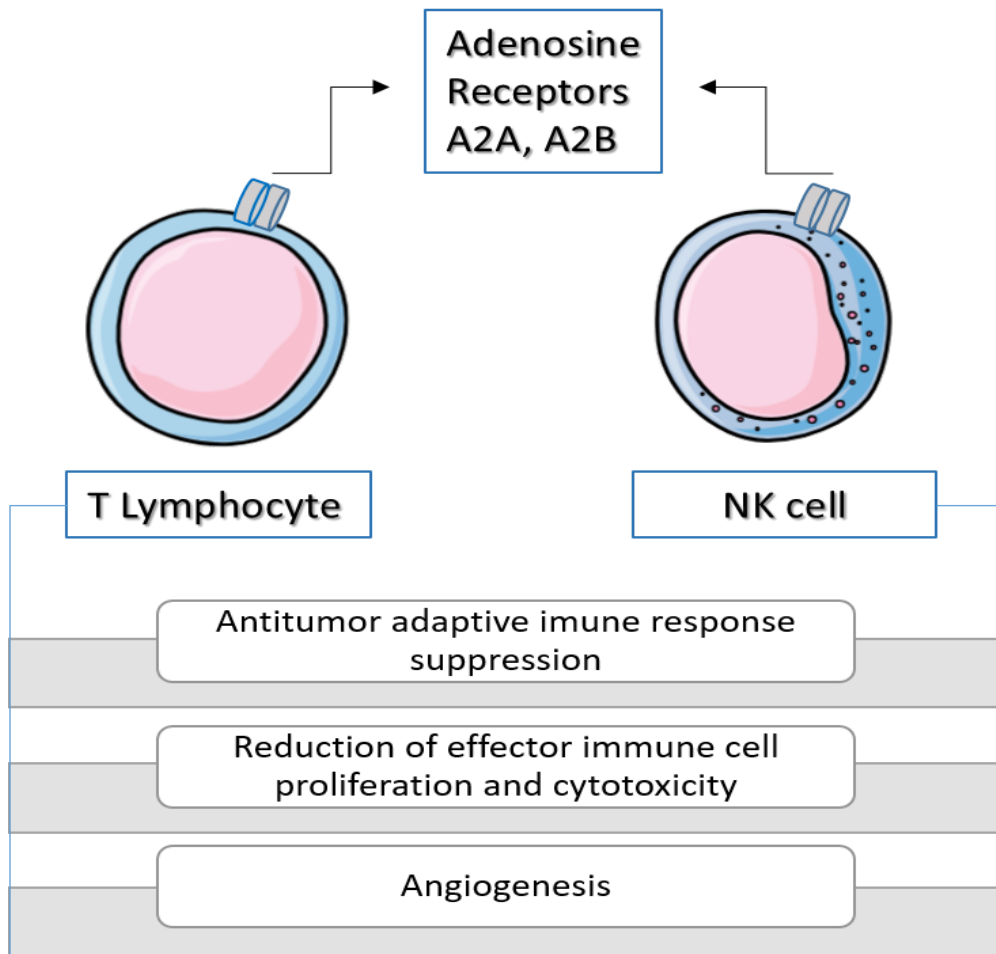


Fig 3



## 5 DISCUSSÃO

O câncer de tireoide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino, correspondendo a 1% de todos os tumores malignos na faixa etária dos 30 aos 74 anos. Tem sido reconhecida uma tendência ao aumento da incidência do câncer de tireoide em várias partes do mundo (REIS, 2010). Certamente, um importante fator que contribuiu para esse aumento foi o aprimoramento da capacidade de detecção de nódulos tireoidianos e da identificação de malignidade desses nódulos, proporcionadas pelo uso crescente de diagnóstico por imagem e pela citologia de material obtido por PAAF (MATSUO et al., 2004; WARD, 2005; DEAN; GHARIB, 2008; REIS, 2010). Geralmente, o câncer de tireoide afeta ambos os sexos, porém, predomina cerca de três vezes mais no gênero feminino do que no masculino (XAVIER et al., 2014). No nosso trabalho, foram selecionados 14 pacientes do sexo feminino e apenas 5 pacientes do sexo masculino, corroborando com os dados disponíveis na literatura sobre a maior incidência do câncer de tireoide no sexo feminino.

Durante os processos neoplásicos podem ocorrer alterações em diversas vias de sinalização celular, e sabe-se que os nucleotídeos extracelulares participam de muitos processos biológicos como o controle da diferenciação e proliferação celular, além da apoptose (BURNSTOCK, 2002). Muitos estudos demonstraram alterações na hidrólise de nucleotídeos de adenina em diversos tipos de câncer, como câncer de pulmão (ZANINI et al., 2012), útero (MALDONADO et al., 2012), próstata (BATTISTI et al., 2011), mama (STAGG et al., 2010a), bexiga (STELLA et al., 2010) e tireoide (SOLINI et al., 2008). Esses resultados reforçam a estreita relação entre as doenças neoplásicas e a atividade das ectoenzimas do sistema purinérgico.

Em nosso estudo, observamos que a hidrólise de nucleotídeos em plaquetas de pacientes com câncer de tireoide está alterada. Avaliamos a atividade da E-NTPDase nas plaquetas desses pacientes e observamos uma redução significativa da sua atividade, sugerindo um aumento da concentração extracelular de ATP. O ATP extracelular é capaz de controlar a inflamação e a resposta imune (DI VIRGILIO, 2005). Níveis elevados de ATP nem sempre são prejudiciais para o paciente, pois também podem ter um efeito benéfico, estimulando a resposta antitumoral do hospedeiro (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017), pois sabe-se que o ATP recruta células apresentadoras de antígenos e promove a maturação de células dendríticas, funcionando como um importante sinal de perigo imunológico (AYMERIC et al., 2010). Em um estudo, no qual foram avaliadas as alterações das atividades das enzimas que degradam nucleotídeos de adenina em plaquetas de pacientes com neoplasia cervical em diferentes estágios e câncer uterino

invasivo, os autores observaram uma redução da atividade da E-NTPDase em todos os estágios quando comparados ao grupo controle, sugerindo que a redução da hidrólise de ATP poderia representar uma tentativa de autoproteção exercida pelas células (MALDONADO et al., 2012)

Ao analisarmos a hidrólise do ADP pela E-NTPDase, também observamos uma significativa redução, sugerindo um aumento da concentração extracelular de ADP. Sabe-se que pacientes com algum tipo de doença neoplásica estão predispostos a desenvolver alterações tromboembólicas (PRANDONI et al., 2005) e que concentrações micromolares de ADP são suficientes para induzir agregação plaquetária (MARCUS et al., 2003). A diminuição da hidrólise de ADP favorece a acumulação desse nucleotídeo no ambiente extracelular, o qual pode promover uma amplificação dessa agregação (ENJYOJI et al., 1999; MARCUS et al., 2001). A redução da hidrólise desse nucleotídeo também foi relatada por Zanini et al. (2012), quando investigaram a atividade da E-NTPDase em plaquetas de pacientes com câncer de pulmão. Os autores também observaram um aumento significativo da agregação plaquetária nos pacientes em relação ao grupo controle, permitindo que eles relacionassem esse fato com o aumento dos níveis extracelulares de ADP.

Em relação à hidrólise do AMP pela E-5'-NT, observamos que ocorreu um significativo aumento dessa hidrólise nas plaquetas dos pacientes. Stagg et al. demonstraram, em uma série de estudos, que a hidrólise do AMP pela E-5'-NT, o passo final na cadeia de reações que leva à geração de adenosina, é crucial para a progressão tumoral (STAGG et al., 2010b; STAGG et al., 2011; STAGG et al., 2012). Os autores observaram que a neutralização ou deleção da E-5'-NT inibe o crescimento tumoral e evita a metástase, apontando para o papel fundamental que a adenosina desempenha na progressão de tumores. Em um estudo utilizando citometria de fluxo, foi demonstrado que a CD73 é amplamente expressa em muitas linhagens de células tumorais e é regulada positivamente em tecidos cancerígenos (JIN et al., 2010). Os altos níveis da sua expressão foram associados à neovascularização tumoral, invasividade e metástase e com menor tempo de sobrevivência dos pacientes (SPYCHALA 2000).

A adenosina extracelular pode ser recaptada por transportadores de nucleosídeos (THORN; JARVIS, 1996), ou ser metabolizada pela ação da ADA. Uma correlação positiva entre baixos níveis dessa enzima e imunidade comprometida no câncer foi relatada (DASMAHAPATRA et al., 1986). Em nosso trabalho, ao avaliarmos a atividade da ADA nas plaquetas e no soro dos pacientes com câncer de tireoide, observamos uma significativa redução da atividade da ADA, tanto nas plaquetas quanto no soro. A adenosina tem propriedades pró-carcinogênicas, entre as quais estão as funções que promovem o crescimento e a estimulação da angiogênese (BOURS et al., 2006; SPYCHALA 2000).

Estudos *in vivo* mostram que o meio extracelular de tumores sólidos possui alto teor de adenosina (OHTA et al., 2006). Devido à bem conhecida atividade imunossupressora da adenosina, esse achado fornece uma dica crucial para a compreensão das estratégias de escape imunológico que ocorrem no câncer (HOSKIN et al., 1994). A imunossupressão mediada por adenosina é um mecanismo fisiológico crítico para proteger os tecidos contra a inflamação excessiva e promover a reparação tecidual após a lesão. No microambiente tumoral, esse processo é explorado para diminuir a imunidade antitumoral e promover a progressão do câncer (ALLARD et al., 2016). A adenosina extracelular produzida através da atividade das ectoenzimas é capaz de regular suficientemente a imunidade antitumoral. A adenosina gerada pela E-5'-NT tumoral prejudica as respostas imunes antitumorais celulares em múltiplos níveis, incluindo ativação de células T, expansão clonal de células T tumor-específicas com funções efetoras auxiliares e citolíticas, morte de células tumorais por linfócitos T citotóxicos (LTC) e sobrevivência desses linfócitos. (DEAGLIO et al., 2007).

Battisti et al. (2013), ao avaliarem a atividade da ADA no soro e nas plaquetas de pacientes com câncer de próstata, observaram uma redução da atividade da mesma, tanto nas plaquetas quanto no soro de pacientes com câncer de próstata avançado, indicando uma consequente elevação da concentração de adenosina nesses pacientes. Em nosso estudo, relacionando o aumento da atividade da E-5'-NT com a redução da atividade da ADA, podemos sugerir a ocorrência de um mecanismo propício para a produção de níveis elevados de adenosina extracelular, com a consequente geração dos efeitos já descritos atribuídos à ela. Os pacientes que participaram desse estudo, no momento da coleta das amostras, apresentavam nódulos palpáveis, indicando um estágio mais avançado do tumor, situação que pode ser correlacionada com as atividades da ADA observadas.

A elevada produção de EROs e o estresse oxidativo persistente têm sido reconhecidos como características de células de carcinoma *in vivo* e *in vitro* (SZATROWSKI, NATHAN, 1991; TOYOKUNI et al., 1995; BROWN, BICKNELL, 2001). Em nosso estudo, observamos um aumento significativo da produção de EROs pelos pacientes com câncer de tireoide. Sabe-se que as células do tumor são as principais responsáveis pela produção e liberação de EROs na circulação (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

Altos níveis de EROs podem contribuir para a carcinogênese e a sinalização mediada por elas pode promover a sobrevivência, proliferação e metástase de células tumorais (WU, 2006), além de causarem danos oxidativos irreversíveis a lipídios, proteínas e DNA, interferindo nas funções vitais das células (FRUEHAUF; MEYSKENS, 2007). Com o objetivo de avaliar a intensidade dos danos biológicos causados pelas EROs em lipídios e proteínas,

determinamos os níveis da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas, respectivamente.

Para avaliação da peroxidação lipídica, determinamos os níveis séricos de TBARS. Níveis elevados de estresse oxidativo resultam em peroxidação de lipídios de membrana, com a geração de peróxidos que podem se decompor em múltiplos produtos carbonílicos mutagênicos, como hidroperóxidos lipídicos e MDA. Em nosso estudo, observamos uma produção significativamente elevada de TBARS pelos pacientes com câncer de tireoide. Os elevados níveis de TBARS observados em nosso estudo corroboram com os níveis demonstrados em outros estudos com diversos tipos de câncer, tais como o câncer de colo uterino, de cabeça e pescoço e de próstata (MALDONADO et al., 2006; GUPTA et al., 2009; BATTISTI et al., 2011).

Para a avaliação da oxidação proteica, determinamos os níveis séricos de proteínas carboniladas. A carbonilação proteica parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2003b). Apesar de todas as biomoléculas presentes nas células serem alvos potenciais para a ação oxidativa das EROs, os ácidos graxos poli-insaturados nos lipídios das membranas celulares mostram-se primariamente sensíveis à oxidação e representam o principal alvo da oxidação por EROs (GUPTA et al., 2009). Acreditamos que, em razão disso, a oxidação proteica não tenha sido tão pronunciada quanto a lipídica.

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicais (BARBOSA et al., 2010). Existem estudos que relatam o efeito do câncer sobre o sistema antioxidante, sendo que alguns demonstram que a defesa antioxidante pode estar agindo no início da transformação neoplásica (KIM et al., 2004). Maldonado et al. (2006), ao avaliar os níveis de GSH em pacientes recém diagnosticadas com câncer de colo uterino, observaram um aumento significativo dos níveis de GSH nessas pacientes, atribuindo essa elevação à ação da defesa antioxidante que ocorre no início da transformação neoplásica, com o objetivo de prevenir o dano tecidual causado pelo estresse oxidativo.

Em nosso trabalho, avaliamos a ação antioxidante dos T-SHs e GSH, sendo que a GSH é a principal representante dos tióis não proteicos devido a sua abundância nas células (REED, 1990). Não identificamos diferença significativa entre os níveis de T-SHs e GSH nos pacientes com câncer de tireoide e grupo controle. Os pacientes que participaram do nosso estudo apresentavam tumores palpáveis, indicando um estágio mais avançado de progressão, fato que pode explicar a inexpressiva alteração desses sistemas antioxidantes. A associação entre o

aumento dos níveis de EROs e a ausência de uma concomitante elevação dos níveis desses sistemas de defesa antioxidante, reflete um ambiente pró-oxidante e correlaciona-se com o aumento da peroxidação lipídica observada nesses pacientes.

Existem muitas evidências que demonstram o envolvimento de colinesterases em funções não clássicas (STEPHENSON et al., 1996; DARVESH et al., 2003) como a proliferação celular e diferenciação (LAYER; WILLBOLD, 1995), sugerindo uma possível influência das colinesterases na tumorigênese. Barbosa et al. (2001), em um estudo no qual avaliaram a atividade histoquímica da BChE em tumores cerebrais, observaram que em tumores cerebrais menos agressivos a atividade da BChE era baixa ou moderada, enquanto que, em tumores agressivos, a atividade era elevada. Em outro estudo, no qual foi determinada a atividade sérica da BChE em pacientes com câncer oral antes da terapia, os pesquisadores identificaram uma atividade de BChE significativamente maior nos pacientes em relação aos controles (PRABHU et al., 2011).

A BChE afeta a proliferação celular em virtude de seus efeitos antiapoptóticos, os quais podem apoiar os estágios iniciais da tumorigênese. Entretanto, ela também pode desempenhar um papel nos estágios posteriores da transformação, colaborando para o crescimento celular (SYED et al., 2008). Em nosso estudo, observamos que a atividade da BChE em pacientes com câncer de tireoide foi significativamente maior em relação aos controles, possivelmente, como já mencionado anteriormente, pelo fato de que os pacientes se encontravam em um estágio mais avançado de progressão tumoral. Dessa forma, podemos sugerir que existe uma relação entre os níveis de atividade da BChE e a progressão tumoral no câncer de tireoide, corroborando com os dados disponíveis para outros tipos de câncer.

Alguns estudos recentes revelaram que a sinalização purinérgica, incluindo a cascata de enzimas responsável por sua modulação, constitui um sistema importante, e não reconhecido anteriormente, que pode ser direcionado como alvo da terapia para o câncer (WHITE, BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2008). Tendo em vista o aumento global da incidência de casos de câncer de tireoide, e a existência de inúmeros casos de câncer agressivo de tireoide resistentes aos tratamentos atualmente disponíveis, conclui-se que a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento desses tipos de tumores é de fundamental importância. Baseados nesse fato, desenvolvemos um manuscrito de revisão que objetivou discutir o papel da sinalização purinérgica no câncer e no câncer de tireoide, e seu potencial como alvo terapêutico para o câncer.

A partir de ampla pesquisa na literatura disponível, verificamos a existência de vários estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram um forte envolvimento de ectonucleotidases,

receptores purinérgicos e adenosina no crescimento e progressão tumoral. Destacamos um estudo realizado por Kondo et al. (2006), no qual os pesquisadores demonstraram uma alta atividade e superexpressão de E-5'-NT/CD73 em um subtipo de câncer de tireoide, com consequente aumento da produção de adenosina extracelular, a qual tem ação imunossupressora bastante conhecida e pode estar relacionada à transformação neoplásica. Nesse trabalho, os autores ainda sugerem que os elevados níveis de adenosina extracelular gerados pela alta atividade da E-5'-NT, podem estar relacionados à transformação neoplásica e que poderiam auxiliar no diagnóstico diferencial desses tumores.

Os resultados observados em nosso trabalho, são semelhantes aos relatados por Kondo et al. (2006), contribuindo para a elucidação do papel desempenhado pela E-5'-NT no câncer de tireoide. Verificamos também, que a busca por mecanismos envolvidos na imunossupressão associada a tumores tem permitido o uso de bloqueadores de CD73 e de receptores de ATP e de adenosina em ensaios clínicos, com o objetivo de desenvolver novas terapias combinadas (OHTA et al., 2006; JIN et al., 2010; STAGG et al., 2010a; ADINOLFI et al., 2012; AMOROSO et al., 2015; YOUNG et al., 2016).



## 6 CONCLUSÕES

- A redução da atividade da E-NTPDase na hidrólise do ATP nas plaquetas dos pacientes com câncer de tireoide, pode levar a um aumento da concentração extracelular de ATP. Essa redução da atividade pode representar uma tentativa de autoproteção exercida pelas células contra a progressão tumoral, já que o ATP é um agente imunoestimulador. Também observamos a redução da atividade da E-NTPDase na hidrólise do ADP, o que pode favorecer a acumulação desse nucleotídeo no meio extracelular. Essa acumulação pode promover um aumento da agregação plaquetária, com consequentes alterações tromboembólicas, situação recorrente durante processos neoplásicos.
- A elevada atividade da E-5'-NT na hidrólise do AMP nas plaquetas dos pacientes com câncer de tireoide, pode indicar um possível aprimoramento da formação de adenosina como reflexo da presença do tumor.
- A reduzida atividade da ADA, tanto nas plaquetas quanto no soro dos pacientes com câncer de tireoide, associada à elevada atividade de E-5'-NT, produz um mecanismo capaz de manter elevados níveis de adenosina extracelular, a qual pode suprimir a imunidade antitumoral e regular a vascularização do tecido neoplásico e, dessa maneira, influenciar o crescimento tumoral. Essa condição correlaciona-se com o grau de evolução dos tumores dos pacientes que participaram do nosso estudo, os quais apresentavam tumores palpáveis de tamanho pronunciado.
- O aumento da produção de EROs pelos pacientes é uma característica de processos neoplásicos. As EROs podem promover a sobrevivência e proliferação de células tumorais, além de causarem danos oxidativos irreversíveis a lipídios, proteínas e DNA.
- A produção de altos níveis de TBARS pelos pacientes, reflete um grau de peroxidação lipídica mais elevado durante o processo tumoral de tireoide.
- Não ocorreu alteração significativa na oxidação proteica nos pacientes com câncer de tireoide. Acreditamos que, em razão de os lipídios representarem as substâncias mais suscetíveis a sofrer

oxidação pela ação das EROs, a oxidação proteica não tenha sido tão pronunciada quanto a lipídica.

- A ausência de alteração dos níveis de T-SHs e GSH nos pacientes pode estar relacionada ao estágio tumoral mais avançado em que se encontravam os pacientes do nosso estudo, pois alterações das defesas antioxidantes são mais comumente observadas nos estágios iniciais de processos neoplásicos. Podemos correlacionar o aumento dos níveis de EROs e a ausência de uma concomitante elevação dos níveis desses sistemas de defesa antioxidante, com o aumento da peroxidação lipídica observada nesses pacientes.
- A elevada atividade da BChE observada nos pacientes, correlaciona-se com o estágio de progressão tumoral apresentado por eles, visto que a BChE pode influenciar os estágios posteriores da transformação neoplásica, colaborando para o crescimento tumoral.
- A partir do manuscrito de revisão, identificamos diversos estudos que demonstram o importante envolvimento da sinalização purinérgica em diferentes processos neoplásicos, além da realização de ensaios clínicos que avaliam os diversos componentes do sistema purinérgico, com o objetivo de identificar alvos para o desenvolvimento de novas terapias para o câncer.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADINOLFI, E.; RAFFAGHELLO, L.; GIULIANI, A. L. et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. **Cancer Res.**, v. 72, p. 2957-2969, 2012.
- ALDUNATE, R. et al. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Reviews**, v. 47, p. 96-104, 2004.
- ALLARD, B.; BEAVIS, P. A.; DARCY, P. K.; STAGG, J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 29, p. 7-16, 2016.
- ALT, F. W. et al. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. **Cell**, v. 152, n. 3, p. 417-429, 2013.
- AMOROSO, F.; CAPECE, M.; ROTONDO, A. et al. The P2X7 receptor is a key modulator of the PI3K/GSK3 $\beta$ /VEGF signaling network: evidence in experimental neuroblastoma. **Oncogene**, v. 34, p. 5240-5251, 2015.
- ANTONIOLI, L. et al. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 842-857, 2013.
- ARDIES, C. M. Inflammation as cause for scar cancers of the lung. **Integrative Cancer Therapies**, v. 2, p. 238-246, 2003.
- ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 153-158, 2001.
- ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of CD39/NTPDase family and thrombus formation: potencial as therapeutic targets. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 36, p. 217-222, 2006.
- AUSTIN, S. K. Haemostasis. **Medicine**, v. 37, n. 1, p. 133-136, 2008.
- AYMERIC L, APETOH L, GHIRINGHELLI F, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. **Cancer Res**, v. 70, p. 855-858, 2010.
- BAKKER, W. W. et al. Platelets and Ectonucleotidases. **Jornal Platelets**, v. 5, n. 3, p. 121-129, 1994.
- BARBOSA, M.; RIOS, O.; VELÁSQUEZ, M. et al. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Histochemical Activities and Tumor Cell Growth in Several Brain Tumors. **Neoplasm**, v. 55, p. 106-112, 2001.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARSOTTI, C.; IPATA, P.L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 2214-2225, 2004.
- BATTISTI, V.; MADERS, L. D. K.; BAGATINI, M. D. et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: Relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 516-524, 2011.
- BATTISTI, V.; MADERS, L. D. K.; BAGATINI, M. D. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: Influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, p. 203-208, 2013.
- BEAL, D. J.; COHEN, R. R.; BURKE, M. J.; MCLENDON, C. L. Cohesion and performance in groups: A Meta-analytic clarification of construct relations. **Journal of Applied Psychology**, v. 88, p. 989-1004, 2003.

- BEHREND, L.; G. HENDERSON; R. M. ZWACKA. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. **Biochem Soc Trans**, v. 31, p. 1441-1444, 2003.
- BERNARDI, C. C. et al. Amplification and deletion of the ACHE and BCHE cholinesterase genes in sporadic breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 197, p. 158-165, 2010.
- BIRK, A. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.140, p.166-175, 2002.
- BITTNER, J. J. The causes and control of mammary cancer in mice. **Harvey Lectures**, v. 42, p. 221-246, 1948.
- BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet actuation. **Blood Reviews**, v. 9, n. 3, p. 143-156, 1995.
- BOND, G. L.; LEVINE, A. J. A. single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1317-1323, 2007.
- BOONE, R. T.; FAN, C. Y.; HANNA, E. Y. Well differentiated carcinoma of the thyroid. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 36, p. 73-90, 2003.
- BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 2, p. 269-278, 2006.
- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, p. 358-404, 2006.
- BOURS, M. J. et al. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 1443-1456, 2011.
- BUFALO, N. E. **Estudo da relação entre o perfil genético de diferentes sistemas de defesa contra xenobióticos nas doenças neoplásicas e autoimune da tireoide**. 2017. 136 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Básicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 22, p. 364-373, 2002.
- BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends in pharmacological Science**, v. 27, p. 166-176, 2006.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 2, p. 659-797, 2007.
- BURNSTOCK G. Purinergic signaling and disorders of the central nervous system. **Nature Rev**, v. 7, p. 575-590, 2008.
- BUSSOLINO, F. et al. Interleukin 1 stimulates platelet activity factor production in cultured human endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, p. 2017-2033, 1986.
- CARREÑO, M. S. R.; PEIXOTO, S.; GIGLIO, A. Reposição hormonal e câncer de mama. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n. 7, p. 41-50, 1999.
- CASTRO, M. R., GHARIB, H. Thyroid fine-needle aspiration biopsy: progress, practice, and pitfalls. **Endocrine Practice**, v. 9, n. 2, p. 128-36, 2003.
- CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry, **Br Med Bull**, v. 49, p. 481-493, 1993.

- CHOW, S. M. et al. Changes in clinical presentation, management and outcome in 1348 patients with differentiated thyroid carcinoma: experience in a single institute in Hong Kong, 1960-2000. **Clinical Oncology**, v. 15, n. 6, p. 329-336, 2003.
- COLGAN, S. P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signaling**, v. 2, p. 351-360, 2006.
- COLONNA, M. et al. A time trend analysis of papillary and follicular cancers as a function of tumour size: a study of data from six cancer registries in France (1983-2000). **European Journal of Cancer**, v. 43, n. 5, p. 891-900, 2007.
- COOK, J. A. et al. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 14, p. 259-266, 2004.
- COOPER, G.M. **Oncogenes**. 2. ed. Boston: Jones & Bartlett Learning, 1995. 384p.
- COOPER, D. S. et al. Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **American Thyroid Association**, v. 16, n. 2, p. 5-8, 2006.
- COOPER, D. S. et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**, v. 19, n. 11, p. 1167-1214, 2009.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.
- CRISTALLI, G. et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v.21, p. 105-128, 2001.
- CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 107-125, 2001.
- DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol Med**, v. 9, p. 169-176, 2003a.
- DALLE-DONNE, I.; ROSSIB, R.; GIUSTARINIB, D.; MILZANI, A.; COLOMBOA, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003b.
- DAL PIZZOL, A. C. et al. Carcinoma Anaplásico de Tireoide: Experiência do Hospital Erasto Gaertner. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 38, n. 3, p. 145-148, 2009.
- DANESE, D. et al. Diagnostic accuracy of conventional versus sonography-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. **Thyroid**, v. 8, p. 15-21, 1998.
- DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, p. 131-138, 2003.
- DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, v. 68, p. 1545-55, 2001.
- DASMAHAPATRA, K. S. et al. Evaluation of adenosine deaminase activity in patients with head and neck cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 40, p. 368-373, 1986.
- DAVIES, L.; WELCH, H. G. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. **JAMA**, v. 295, n. 18, p. 2164-2167, 2006.
- DEAGLIO, S.; DWYER, K. M.; GAO, W. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **J Exp Med**, v. 204, p. 1257-1265, 2007.

- DEAN, D. S., GHARIB, H. Epidemiology of thyroid nodules. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v.22, n.6, p. 901-911, 2008.
- DELELLIS, R. A.; LLOYD, R. V.; HEITZ, P. U. et al. (Eds): **World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs**. 3 ed. IARC Press: Lyon, France, 2004. 320p.
- DELFINO, A. B. et al. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose - carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.43, n.3, p.173-186, 1997.
- DENG, C.; BRODIE, S. G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Cancer Biology**, v. 11, p. 387-394, 2001.
- DI CRISTOFARO, J. et al. Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. **Human Pathology**, v. 37, p. 824-883, 2006.
- DI VIRGILIO, F. et al. The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: A novel immunomodulatory receptor. **Progress in Brain Research**, v. 120, p. 355-368, 1999.
- DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587-600, 2001.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signaling**, v. 1, n. 3, p. 205-209, 2005.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic signaling in the immune system. A brief update. **Purinergic signaling**, v. 3, p.1-3, 2007.
- DI VIRGILIO F.; BOEYNAEMS, J.; ROBSON, S. C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion in Pharmacology**, v.9, p. 507-513, 2009.
- DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, n. 3, p. 293-303, 2017.
- ENJYOJI, K. et al. Target disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase result in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v.5, p. 1010-1017, 1999.
- FIGUEIREDO, I. F. T. **Identificação de alterações moleculares envolvidas na progressão e desdiferenciação dos carcinomas da tireoide**. 2012. 108 p. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.
- FILIPPINI, A. et al. Ecto-ATPase activity in cytolytic T lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 334-340, 1990.
- FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 283-294, 1997.
- FRANCO, R. et al. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. **Critical Reviews in Immunology**, v. 27, n. 6, p. 495-509, 2007.
- FRUEHAUF, J. P.; MEYSKENS, F. L. JR. Reactive oxygen species: a breath of life or death? **Clin Cancer Res**, v. 13, p. 789-794, 2007.
- FURLANETTO, T. W. et al. Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 331-334, 2000.
- GAYLE III, R. B. et al. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 9, p. 1851-1859, 1998.

GHARIB, H. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations, and effect. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 69, n. 1, p. 44-49, 1994.

GIUSTARINI, D. et al. Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: Influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, p. 141-148, 2011.

GODIC, A.; POLJSAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment, **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, 2014.

GODING, J.W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 285-311, 2000.

GOLBERT, L. et al. Carcinoma diferenciado da tiroide: avaliação inicial e acompanhamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n. 5, p. 701-710, 2005.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11ª Ed., Editora: McGraw-Hill, 1844 p., 2006.

GOTO, H. et al. Lack of mitochondrial depolarization by oxidative stress is associated with resistance to buthionine sulfoximine in acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 31, p. 1301-1309, 2007.

GOYAL, N. et al. Molecular and genetic markers of follicular-cell thyroid cancer: etiology and diagnostic and therapeutic opportunities. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 779, p. 309-326, 2013.

GRIMSRUD, P. A.; XIE, H.; GRIFFIN, T. J.; BERNLOHR, D. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. **J Biol Chem**, v. 283, p. 21837-21841, 2008.

GUAN, Z.; OSMOND, D. A.; INSCHO, E.W. Purinoceptors in the kidney. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 6, p. 715-726, 2007.

GUEMBAROVSKI, R. L. **Análise de associação dos genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 e da perda de heterozigose em 3p em portadores de carcinomas bucais**. 2007. 151 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

GUPTA, A.; BHATT, M. L. B.; MISRA, M.K. Lipid peroxidation and antioxidant status in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 68-72, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free Radicals in biology and medicine**. 3ª Ed. Oxford, New York, 2000.

HARACH, H. R.; FRANSSILA, K. O.; WASENIUS, V. M. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A “normal” finding in Finland. A systematic autopsy study. **Cancer**, v. 56, n. 3, p. 531-538, 1985.

HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 427-433, 2000.

HOSKIN, D. W.; REYNOLDS, T.; BLAY, J. Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumors. **International Journal of Cancer**, v. 59, p. 854-855, 1994.

HOWLADER N. et al. (EDs). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). **National Cancer Institute**, Bethesda, MD, abr. 2012. Disponível em: <[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2009\\_pops09/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/)>. Acesso em: 04 jul. 2017.

IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H. K. Nucleotide signaling during inflammation. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 310-317, 2014.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Condutas do INCA/MS. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 2, p. 181-185, 2002.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> Acesso em: 22 set. 2018.

ITALIANO, J. E.; HARTWIG, J. H. Megakaryocyte development and platelet formation. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. 2ed. California: Academic Press, 2011. cap. 2, p. 23-44.

ITO, Y. et al. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. **World Journal of Surgery**, v. 34, n. 1, p. 28-35, 2010.

ITO, Y. et al. Increasing incidence of thyroid cancer: controversies explored. **Nature Reviews Endocrinology**, v.9, n. 3, p.178-184, 2013.

JARVIS, M. F.; KHAKH, B. S. ATP-gated P2X cation channels. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 208-215, 2009.

JIN, D. et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. **Cancer Research**, v. 70, p. 2245-2255, 2010.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 201-212, 2011.

KACZMARECK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33116-33122, 1996.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'- nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 6, p. 2157-2162, 2000.

KENT, W. D. T. et al. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. **Canadian Medical Association or its licensors**, v. 177, n. 11, p. 1357-1361, 2007.

KILFOY, B. A. et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. **Cancer Causes & Control**, v. 20, n. 5, p. 525-531, 2009.

KIM, S. J. et al. Ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy in non palpable thyroid nodules: is it useful in infra centimetric nodules? **Yonsei Medical Journal**, v. 44, p. 635-640, 2003.

KIM, Y. T.; KIM, J. W.; CHOI, J. S. et al. Relation between deranged antioxidant system and cervical neoplasia. **Int J Gynecol Cancer**, v. 14, p. 889-895, 2004.

KLAUNIG, J. E.; XU, Y.; ISENBERG, J. S.; BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K. L.; JIANG, J. et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. **Environ Health Perspect**, v. 106, p. 289-295, 1998.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 44, p. 239-267, 2004.

KONDO, T.; NAKAZAWA, T.; MURATA, S. I.; KATOH, R. Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. **Histopathology**, v. 48, p. 612-614, 2006.

KUNAPULI, S. P. et al. Platelet Purinergic receptors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 175-180, 2003.

LAYER, P. G.; WILLBOLD, E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. **Prog Histochem Cytochem**, v. 29, p. 1-94, 1995.

LAYER PG, SPORNS O. Spatiotemporal relation of embryonic cholinesterase with cell proliferation in chick brain and eye. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 84, p. 284-288, 1987.

LAYER PG, ALBERT R, RATHJEN FG. Sequential activation of butyrylcholinesterase in rostral half somites and acetylcholinesterase in motoneurons and myotomes preceding growth of motor axons. **Development**, v. 102, p. 387-396, 1988.



- LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ectoapyrase; ecto-diphosphohydrolase, CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica & Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9-15, 2005.
- LEENHARDT, L. et al. Advances in diagnostic practices affect thyroid cancer incidence in France. **European Journal of Endocrinology**, v. 150, p. 133-139, 2004.
- LEON, C. et al. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. **FEBS Letters**, v. 403, p. 26-30, 1997.
- LEOPOLD, J.A.; & LOSCALZO, J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1673-1706, 2009.
- LEUNG, A. M.; PEARCE, E. N.; BRAVERMAN, L. E. Perchlorate, iodine and the thyroid. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 133-141, 2010.
- LEVIN, J. The evolution of mammalian platelets. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. 2 ed. California: Academic Press, 2011. cap. 1, p. 3-22.
- LI, X.; QU, Z. C.; MAY, J. M. GSH is required to recycle ascorbic acid in cultured liver cell lines. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 3, p. 1089-1097, 2001.
- LIMA, M. A. et al. Alcooalização de nódulo tireoidiano em região endêmica de bócio colóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 6, p. 1007-1012, 2007.
- LINCOLN, J.; BURNSTOCK, G. The neural endothelial interactions in control of local blood flow In: Warren, ed. **The endothelium: an introduction in current research**. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 21-33.
- LINDEN J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor mediated mechanisms of tissue protection. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 775-787, 2001.
- LOCKRIDGE, O. et al. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, p. 549-557, 1987a.
- LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S.; LA DU, B.N. Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, p. 12945-12952, 1987b.
- LORENZI, T. F. et al. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 655 p.
- LOURO, I.D. Oncogenética. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n.11, p. 36-42, 2000.
- LUNKES, G. I. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan induced diabetes. **Diabetes Research Clinical Practice**, v. 65, p. 1-6, 2004.
- LUOTTO, R. et al. Plasma-prolactin in human breast cancer. **The Lancet**, p. 433-434, 1997.
- MALAGUARNERA, R.; VIGNERI, R.; FRASCA, F. p53 family proteins in thyroid cancer. **Endocrine-related cancer**, v.14, p.43-60, 2007.
- MALDONADO, P. A.; NEGRINI, L. A.; KAIZER, R. R. et al. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 174-178, 2006.
- MALDONADO, P. A. et al. Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 66, p.6-11, 2012.
- MALISZEWSKI, C.R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. **The Journal of Immunology**, v. 153, p. 3574-3583, 1994.

- MARCUS, A. J. et al. Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 178-182, 2001.
- MARCUS, J.A. et al. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/Ectonucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, p. 9-16, 2003.
- MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiological Reviews**, v.83, p.337-376, 2003.
- MARNETT, L. J. Oxy radicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 361-370, 2000.
- MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.
- MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 31-91, 1993.
- MATSUO SE, MARTINS L, LEONI SG, HAJJAR D, RICARTE-FILHO JCM, EBINA KN, KIMURA ET. Marcadores Biológicos de tumores tiroidianos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.48, n.1, p.114-125, 2004.
- MCKINNELL, R.G. Cancer genetics. In: McKINNELL, et al. (Ed.). **The biological basis of cancer**. Cambridge: Cambridge University, 1998. p.79-114.
- MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4 ed. Iowa State: Univ. California, 2002. 788p.
- MULLER G, LIPP M. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR5: structural requirements for G protein activation analyzed by chimeric CXCR1/CXCR5 molecules. **Biol Chem**, v. 382, p. 1387-1397, 2001.
- NAWROTH, P.; STERN, D. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 164, p. 740-749, 1986.
- NEGRI, E. et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. II. Menstrual and reproductive factors. **Cancer Causes & Control**, v. 10, n. 2, p. 143-155, 1999.
- NIX, P. et al. Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer. **International Journal of Clinical Practice**, v. 59, p. 1340-1344, 2005.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287- 1312, 2001.
- OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**, v. 414, p. 916-920, 2001.
- OHTA, A. et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 13132-13137, 2006.
- OURY, C. et al. The ATP-gated P2X1 ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, p. 1264-1271, 2001.
- PALEARI, L.; GROZIO, A.; CESARIO, A.; RUSSO, P. The cholinergic system and cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 18, p. 211-217, 2008.
- PAPAMICHOS-CHRONAKIS, M.; PETERSON, C. L. Chromatin and the genome integrity network. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 1, p. 62-75, 2013.
- PARK, H. S.; HOURANI, S. M. Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1359-1366, 1999.

- PERATONI, A.O. Carcinogenesis. In: McKINNEL et al. (Ed.). **The biological basis of cancer**. Cambridge: Cambridge University, 1998. p. 75-114.
- PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225-230, 1996.
- PINES, J. Cyclins, CDKs and cancer. **Cancer Biology**, v. 6, p. 63-72, 1995.
- PISOSCHI, A. M; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.
- POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants, **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, 2013.
- PRABHU, K.; NAIK, D.; RAY, S. et al. Significance of serum butyrylcholinesterase levels in oral cancer. **Australasian Medical Journal**, v. 7, p. 374-378, 2011.
- PRADO, M. A. M. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry Internacional**, v. 41, p. 291-299, 2002.
- PRANDONI, P.; FALANGA, A.; PICCIOLI, A. Cancer and venous thromboembolism. **The Lancet Oncology**, v. 6, p. 401-410, 2005.
- RABINOVICH, G. A.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 267-296, 2007.
- RAKONCZAY, Z. et al. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chemical Biological Interactions**, v. 157-158, p. 233-238, 2005.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacology reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.
- RAND, J. D. Acetylcholine. Program in Molecular, **Cell and Developmental Biology**, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK 73104 USA, 2007.
- RANG, H. P. et al. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. (Ed). **Farmacologia**. Elsevier, Sao Paulo, Brasil, p. 674-695, 2004.
- RAVETTO, C.; COLOMBO, L., DOTTORINI, M. E. Usefulness of fine-needle aspiration in the diagnosis of thyroid carcinoma: a retrospective study in 37,895 patients. **Cancer**, v. 90, p. 357-363, 2000.
- REIS, A. A. S. **Estudo da associação do polimorfismo genético em carcinomas da tireóide**. 2010. 98 f. Tese (Doutorado Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2010.
- REED, D.J. Glutathione: toxicological implications. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, v. 30, p. 603-631, 1990.
- REMIJIN, J. at al. Role of ADP receptor P2Y12 in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.22, p. 686-691, 2002.
- ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signaling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.
- ROLF, M. G.; BREARLEY, C. A.; MAHAUT-SMITH, M. P. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha, beta-methylene ATP. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 85, p.303-308, 2001.
- ROSARIO, P. W. et al. Nódulo tireoidiano e câncer diferenciado de tireoide: atualização do consenso brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.57, n. 4, p. 240-264, 2013.

- SABOURY, A. A. et al. Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration calorimetry. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 849-855, 2003.
- SALAZAR-GONZALEZ, J.F. et al. Reduced ecto-5'-nucleotidase activity and enhanced OKT10 and HLA-DR expression on CD8 (T suppressor/cytotoxic) lymphocytes in the Acquired immune Deficiency Syndrome: evidence of CD8 cell immaturity. **The Journal of Immunology**, v. 135, n. 3, p. 17778-17785, 1985.
- SAMIR, M.; KHOLY, N. M. E. Thiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer. **Clin Otolaryngol**, v. 24, p. 232-234, 1999.
- SANTARPIA, L.; ALFONSI, L.; PASANISI, F. et al. Predictive factors of survival in patients with peritoneal carcinomatosis on home parenteral nutrition. **Nutrition**, v. 22, p. 355-360, 2006.
- SARANAC, L. et al. Why is the thyroid so prone to autoimmune disease? **Hormone research in Pediatrics**, v.75, n. 3, p.157-165, 2011.
- SCHETINGER, M. R. C. et al. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, p. 731– 41, 2001.
- SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Bio Factors**, v. 31, p. 77-98, 2007.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Review Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, p. 453-462, 2014.
- SCHLUMBERGER, M. J.; TORLANTANO, M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 601-613, 2000.
- SCHULZE, H.; SHIVDASANI, R. A. Mechanisms of thrombopoiesis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1717-1724, 2005.
- SEIZI, O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Segunda edição, Editora Ateneu, 2003 p.39-48.
- SERRALHEIRO, P. M. A. et. al. Carcinoma Indiferenciado da Tireoide - Um Caso Incomum. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, n. 20, p. 59-64, 2012.
- SEVEN, A.; CIVELEK, S.; INCI, E.; KORKUT, N.; BURCAK, G. Evaluation of oxidative stress parameters ,in blood of patients with laryngeal carcinoma. **Clin Biochem**, v. 32, p. 369-673, 1999.
- SGARBI, J. A.; MACIEL, R. M. B. Patogênese das doenças tireoidianas autoimunes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 1, p. 5-14, 2009.
- SITKOVSKY, M. V. et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia inducible factors and adenosine A2A receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 657-682, 2004.
- SITKOVSKY, M. V. et al. Hypoxia adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 5947-5952, 2008.
- SLOWINNSKA-KLENCKA, D. et al. Non-diagnostic cytological outcome of thyroid biopsy and the risk of thyroid malignancy. **Endocrine Pathology**, v. 15, p. 65-75, 2004.
- SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.
- SOSLAU, G. et al. Extracellular ATP inhibits agonist-induced mobilization of internal calcium in human platelets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1268, p. 73-80, 1995.

- SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKOM, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology**, v. 1355, p.131–140, 1997.
- SOSLAU, G.; SCHECHNER, A. J.; ALCASID, P. J. Class R. Influence of vortex speed on fresh versus stored platelet aggregation in the absence and presence of extracellular ATP. **Thrombosis Research**, v. 97, p. 15-27, 2000.
- SOLINI A, CUCCATO S, FERRARI D, et al. Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: A new potential marker of the disease? **Endocrinology**, v. 149, p. 389-396, 2008.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 1547-1552, 2010a.
- STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncogene**, v. 29, p. 5346-5358, 2010b.
- STAGG, J. et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. **Cancer Research**, v. 71, p. 2892-2900, 2011.
- STAGG, J. et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 72, p. 2190-2196, 2012.
- STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterase: unity and diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, p. 542-550, 2006.
- STELLA J, BAVARESCO L, BRAGANHOL E, et al. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. **Urol Oncol Semin Orig Investig**, v. 28, p. 260-267, 2010.
- STEPHENSON, J.; CZEPULKOWSKI, B.; HIRST, W.; MUFTI, G. J. Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). **Leuk Res**, v. 20, p. 235-241, 1996.
- STERN, D. et al. Self regulation of procoagulant events on the endothelial cell surface. **Journal of Experimental Medicine**, v. 162, p. 1223-1228, 1985.
- SYED, M.; FENOGLIO-PREISER, C.; SKAU, K. A.; WEBER, G. F. Acetylcholinesterase supports anchorage independence in colon cancer. **Clin Exp Metastasis**, v. 25, p. 787-798, 2008.
- SZATROWSKI, T. P.; NATHAN, C. F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Res**, v. 51, p. 794-798, 1991.
- TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. In: SIEGEL, G. J. et al. **Lippincott-Raven Publishers**. Philadelphia, USA. 1999. p. 214-242.
- THOMPSON, L. F. et al. J.F. Ecto-5'-nucleotidase expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammaglobulinemia. **The Journal of Immunology**, v. 137, p. 2496-500, 1986.
- THORN, J. A.; JARVIS, S. M. Adenosine transporters. **General Pharmacology**, v. 27, p. 613-620, 1996.
- TOMIMORI, E.; PEDRINOLA, F.; CAVALIERE, H. et al. Prevalence of incidental thyroid disease in a relatively low iodine intake area. **Thyroid**, v. 5, p. 273-276, 1995.
- TORRES, B. B. Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

- TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 57, p. 145-155, 2003.
- TOYOKUNI S, OKAMOTO K, YODOI J, HIAI H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Lett**, v. 358, p. 1-3, 1995.
- TUTTLE, R. M. et al. Thyroid carcinoma. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 8, p. 1228-1274, 2010.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical and Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VANNI, D. S. et al. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 181-189, 2007.
- VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.
- WARD, P. A. et al. Regulatory effects of adenosine and adenine nucleotides on oxygen radical responses of neutrophils. **Laboratory Investigation**, v. 58, n. 4, p. 438-447, 1988.
- WARD, L. S. et al. A citologia do material obtido por punção aspirativa da tireoide como método único indicativo de cirurgia: análise de custo-benefício. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 37, p. 18-22, 1993.
- WARD, L. S.; ASSUMPTÇÃO, L. V. M. Câncer Diferenciado da Tiróide: Fatores Prognósticos e Tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 126-136, 2004.
- WARD, L. S. Epidemiologia do câncer de tireoide no Brasil: apontando direções na política de saúde do país. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n. 4, p. 474-476, 2005.
- WEKSLER, B. B. Platelets In: Gallin, Goldstein, Snyderman (Eds). **Inflammation, basic principles and clinical correlates**, 2 ed. New York: Raven Pr, 1992, p. 727-746.
- WELKER, M. J.; ORLOV, D. Thyroid nodules. **American Family Physician**, v. 66, p. 559-566, 2003.
- WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C.J.; RACKE, K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, p. 59-79, 1998.
- WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, p. 211-217, 2006.
- WILSON, J. A. **Effective Head and Neck Cancer Management**, 3ed. London: British Association of Otorhinolaryngologists Head and Neck Surgeons, 2002.
- WU, W. S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, p. 695-705, 2006.
- WU, B.; GUO, D.; GUO, Y. Association between p53 Arg72pro polymorphism and thyroid cancer risk: a meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 35, n. 1, p. 561-565, 2013.
- XAVIER, M. A. C. et al. Revisão bibliográfica – Carcinoma indiferenciado da tireoide. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 1, n. 4, p. 7-13, 2014.
- XING, M. BRAF mutation in thyroid cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, p. 245-262, 2005.

- XING, M.; HAUGEN, B. R.; SCHLUMBERGER, M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. **The Lancet**, v. 38, n. 9871, p. 1058-1069, 2013.
- YAMAMOTO, Y. et al. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A study of 408 autopsy cases. **Cancer**, v. 65, p. 1173-1179, 1990.
- YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. **Biochimic et Biophysic Acta**, v. 1783, p. 673-694, 2008.
- YOUNG, A et al. Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 8, p. 879-888, 2014.
- YOUNG, A.; NGIOW, S. F.; BARKAUSKAS, D. S. et al. Co-inhibition of CD73 and A2AR adenosine signaling improves anti-tumor immune responses. **Cancer Cell**, v. 30, p. 391-403, 2016.
- YOUSRI, R.; NOAMAN, E.; EL SHAWI, O.; FAHMY, N.; GHAZ, M. Evaluation of antioxidant status and radioprotective activity of a novel anti-cancer drug in mice. **J Cancer Ther.**, v. 2, p. 616-628, 2011.
- ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 1, p. 40-45, 2012.
- ZHANG, B. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. **Cancer Research**, v. 70, n. 16, p. 6407-6411, 2010.
- ZIMMERMANN, H. et al. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**, v. 32, p. 421-425, 1998.
- ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedebergs archives of pharmacology**, v. 362, p. 299-309, 2000.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

**Título do projeto:** “*Câncer de tireoide: estudo da expressão de proteínas relacionadas a apoptose, resistência a múltiplas drogas e sinalização purinérgica*”

**Pesquisadora responsável:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Bitencourt Rosa Leal

**Instituição/Departamento:** Departamento de Microbiologia e Parasitologia– UFSM

**Telefone e endereço postal:** (55) 3220-9581 ou (55) 99979 3700. Avenida Roraima, 1000, prédio 20, sala 4102, 97105-970 - Santa Maria – RS.

**Local de coleta de dados:** \_\_\_\_\_

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_ anos

**Responsável legal:** \_\_\_\_\_

**Você está sendo convidado a participar da pesquisa** “CÂNCER DE TIREOIDE: ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A APOPTOSE, RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA”

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia com atenção o que está escrito e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será punido(a) de forma alguma. Convidamos você também a responder algumas perguntas, de forma voluntária, tendo o direito de desistir a qualquer momento.

**Objetivo:** A pesquisa avaliará algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com câncer de tireoide. Buscamos um melhor entendimento sobre essa doença e gerar informações capazes de, no futuro, auxiliar no controle e no estabelecimento de novos tratamentos.

**Procedimento e riscos:** Será realizada uma coleta de sangue de 10 ml. É importante informar que a participação na pesquisa não oferece danos à sua saúde. A coleta será realizada por um profissional especializado, sendo este procedimento seguro, mas que pode, às vezes, trazer algum leve desconforto devido à picada da agulha. O local da coleta de sangue poderá ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde. Providências serão tomadas a fim de se evitar os riscos da coleta, portanto, se o local da coleta ficar arroxeadado, será realizada uma compressão no local durante pelo menos dois minutos e compressas frias serão utilizadas, auxiliando na redução da dor. Ao responder ao questionário você poderá sentir um leve cansaço.

**Benefícios:** Os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante para melhorar nossos conhecimentos sobre o câncer de tireoide. Ao participar desta pesquisa o(a) senhor(a) não terá gasto ou lucro financeiro e não será feito qualquer tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa.

**Confidencialidade:** as informações fornecidas no questionário serão de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome. Os dados serão arquivados por um período de 5 anos e posteriormente destruídos. O material biológico será coletado e guardado em local seguro por até 1 ano, utilizados unicamente para os fins descritos e após este período serão descartados.



**Consentimento da participação da pessoa como sujeito**

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo que fui convidado. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Câncer de tireoide: estudo da expressão de proteínas relacionadas a apoptose, resistência a múltiplas drogas e sinalização purinérgica”. Eu discuti com a pesquisadora Patrícia Bernardes Cavalheiro sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu acompanhamento/assistência/tratamento neste Serviço.

Declaro, também, que recebi cópia do presente Consentimento Livre e Esclarecido.

Santa Maria, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

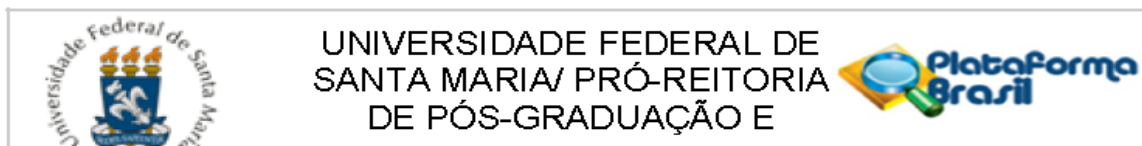
\_\_\_\_\_  
Assinatura do coordenador do projeto

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa: Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - sala 702,  
Cidade Universitária - Bairro Camobi – CEP: 97.105-900 - Santa Maria - RS. Tel: (55) 3220 9362,  
e-mail: [comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br](mailto:comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br)

## ANEXOS

### ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Câncer de tireoide: estudo da expressão de proteínas relacionadas a apoptose, resistência a múltiplas drogas e sinalização purinérgica

**Pesquisador:** Daniela Bitencourt Rosa Leal

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 49552515.9.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.343.790

##### Apresentação do Projeto:

A glândula tireoide está associada a diversas patologias, dentre elas, a ocorrência de nódulos tireoidianos, a qual vem crescendo nos últimos anos. A melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos na iniciação e progressão do câncer da tireoide pode auxiliar na identificação de pacientes com carcinomas de baixo e alto risco. A proteína p53 possui um papel essencial na prevenção do câncer, pois ela induz a apoptose de células lesadas. Mutações dessa proteína estão, frequentemente, associadas com uma maior probabilidade ao desenvolvimento tumoral e com uma maior resistência à ação de agentes quimioterápicos. A apoptose induzida pela quimioterapia é mediada por radicais livres e outras moléculas relacionadas à sinalização celular. Dentre os mediadores capazes de modular processos imunes, tais como a diferenciação celular, destacam-se o ATP, o ADP, o AMP e a adenosina, cujas concentrações extracelulares são controladas pela atividade das ectoenzimas E-NTPDase (CD39), E-NPP, E-5'-nucleotidase (CD73) e adenosina desaminase (E-ADA) e que agem em receptores específicos, formando o sistema purinérgico. Serão estudados marcadores sorológicos dos sistemas citados, em 60 indivíduos com diagnóstico comprovado de câncer de tireoide, atendidos no ambulatório de Cabeça e Pescoço do HUSM. A coleta por punção venosa será realizada no próprio ambulatório, pelo pesquisador responsável.

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

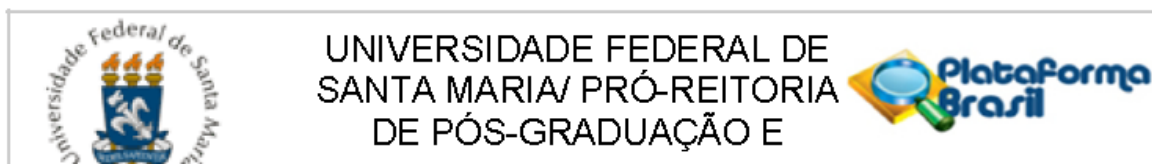
**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.343.790

Será também solicitado que o paciente responda um questionário para obtenção de informações complementares, importantes para o estudo (em anexo).

Será constituído também um grupo de 80 (oitenta) indivíduos saudáveis que serão considerados controles. Estes não deverão apresentar doenças auto-imunes, inflamatórias ou alterações plaquetárias, o que será verificado através do resultado de testes laboratoriais, cujos resultados serão provenientes do Banco de Dados do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, com autorização do setor de registro medico do HUSM para consulta dos prontuários. Este indivíduo será contactado através de contato telefonico, e convidado a participar do estudo. Caso concorde, será marcado uma hora e local para coleta da amostra e apresentação do TCLE.

As análises estatísticas serão realizadas utilizando o programa Graphpad Prism 6. Todas as variáveis serão testadas para normalidade de distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados serão expressos como média  $\pm$  desvio padrão

#### **Objetivo da Pesquisa:**

GERAL: avaliar a expressão das proteínas relacionadas a apoptose, a resistência a múltiplas drogas e a sinalização purinérgica e o seu possível envolvimento no câncer da glândula tireoide em humanos.

#### ESPECÍFICOS:

Em pacientes com câncer de tireoide e indivíduos sadios :

- Verificar a atividade das enzimas E-NTPDase e E-ADA em linfócitos;
- verificar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e EADA em plaquetas;
- Avaliar as concentrações de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina em soro;
- Avaliar o perfil de agregação plaquetária;
- Determinar a expressão de CD39, CD73, E-ADA e do receptor purinérgico P2X7 em linfócitos e plaquetas;
- Determinar os níveis séricos de citocinas referentes às respostas Th1, Th2, Th9, Th17 e Th22 em soro;
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica de TTF-1, p53, p63, CK19, Galectina-3, -catenina, S100, Ki-67 e Tireoglobulina em biópsias da tireóide;
- Avaliar a expressão de proteínas associadas a apoptose;
- Avaliar a expressão de proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MDR).

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

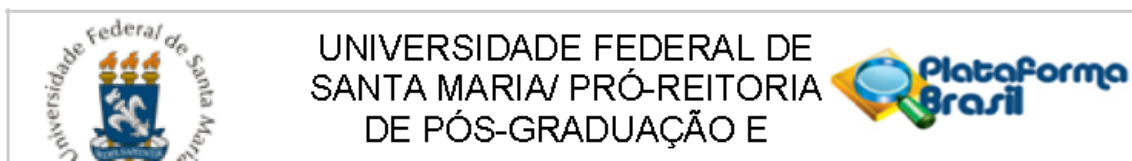
**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.343.790

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

RISCOS: será realizada uma coleta de sangue de 10mL da veia podendo este procedimento trazer algum leve desconforto devido à picada da agulha. O local da coleta de sangue poderá ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias. Caso isto ocorra será realizado uma compressão no local durante pelo menos dois minutos e compressas frias serão utilizadas, auxiliando na redução da dor. Ao responder ao questionário também poderá haver um leve cansaço.

BENEFÍCIOS: indiretos, através do conhecimentos sobre o câncer de tireoide.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta folha de rosto, registro, autorização institucional, termo de confidencialidade, e TCLE devidamente redigidos e assinados.

**Recomendações:**

Veja no site do cep - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. ACOMPANHE AS ORIENTAÇÕES DISPONÍVEIS, EVITE PENDÊNCIAS E AGILIZE A TRAMITAÇÃO DO SEU PROJETO.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_574226.pdf	23/11/2015 23:55:07		Aceito
Declaração de Instituição e	registroep.pdf	23/11/2015 23:54:02	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

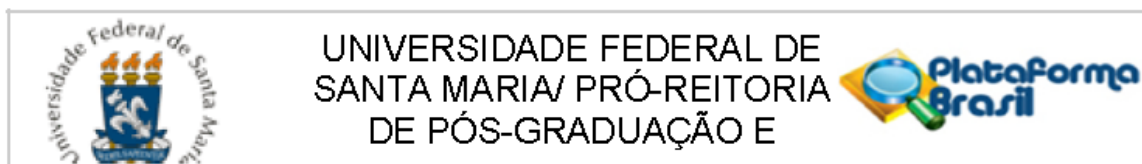
**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

Continuação do Parecer: 1.343.790

Infraestrutura	registroep.pdf	23/11/2015 23:54:02	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPatricia.docx	05/11/2015 22:40:12	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
Folha de Rosto	folharostopatricia.pdf	25/09/2015 11:07:34	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	RegistroGAP.pdf	19/08/2015 15:32:13	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	19/08/2015 15:31:40	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1.pdf	19/08/2015 15:31:24	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PatriciaConfidencialidade.pdf	19/08/2015 15:31:01	Daniela Bitencourt Rosa Leal	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SANTA MARIA, 30 de Novembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**CLAUDEMIR DE QUADROS**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970

**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

## ANEXO B - CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II

**Clinical and Experimental Medicine**  
**THE INVOLVEMENT OF PURINERGIC SIGNALING IN THYROID CANCER AND ITS**  
**ROLE AS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	CLEM-D-18-00558
<b>Full Title:</b>	THE INVOLVEMENT OF PURINERGIC SIGNALING IN THYROID CANCER AND ITS ROLE AS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET
<b>Article Type:</b>	Review Article
<b>Keywords:</b>	thyroid cancer; purinergic signaling; ATP; CD39; CD73; adenosine
<b>Corresponding Author:</b>	Daniela Leal Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal de Santa Maria
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Patrícia Bernardes Cavalheiro
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Patrícia Bernardes Cavalheiro Viviane Martins Bernardes Daniela Ferreira Passos Paulo Guilherme Schimittes Daniela Leal
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract</b>	Thyroid cancer is an endocrine malignancy whose global incidence has increased rapidly over the last decades. Although most cases of thyroid cancer have a good survival rate, a subset of cases demonstrates resistance to conventional treatment and high rates of recurrence and metastasis. Recently, many studies have reported the role of extracellular nucleotides such as adenosine 5'-triphosphate (ATP), and nucleosides, such as adenosine, as important modulators in the tumor microenvironment. Given the global increase in the incidence of thyroid cancer and evidence of the involvement of purinergic signaling in tumor, we will discuss the role of the purinergic signaling in cancer and thyroid cancer and its potential as a therapeutic target for cancer. We have searched electronic databases for papers on the subject. We found many in vitro and in vivo studies that demonstrated the participation of ectonucleotidases, purinergic receptors and adenosine in tumor growth and progression, as well as clinical studies using the enzyme ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT/CD73) and ATP and adenosine receptor blockers as antitumor agents. The recognition of the involvement of purinergic signaling in cancer and, hence, the transformation of its components into therapeutic targets for the different types of tumors is of fundamental importance, especially for aggressive thyroid cancer, which is resistant to the different currently available treatments.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Ryszard Smolenski Uniwersytet Gdanski rt.smolenski@gumed.edu.pl Expertise Country: Poland Davide Ferrari

	Universita degli Studi di Ferrara davide.ferrari@unife.it Expertise
	Country: Italy
	Stanko Stojilkovic National Institute of Child Health and Human Development stojilkovic@helix.nih.gov Expertise
	Country: United States