

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

**ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS E DE
COLINESTERASES E BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES
COM CÂNCER DE PULMÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniela Zanini

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS E DE COLINESTERASES E
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO**

Daniela Zanini

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS, Brasil

2012

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS E DE COLINESTERASES E
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES
COM CÂNCER DE PULMÃO**

elaborada por
Daniela Zanini

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger
(Presidente/Orientador)

Prof.^a Dr.^a Paula Acosta Maldonado/UFSM

Prof.^a Dr.^a Marina Prigol/UNIPAMPA

Santa Maria, 02 de março de 2012.

*A meu pai Dalamir Zanini e a minha mãe Cleonice Graciolli Zanini,
por serem verdadeiros exemplos de honestidade, persistência e bravura.
Pessoas incansáveis que me ensinaram a dar valor às conquistas, às pessoas e à
vida.*

*A minha maninha Angela Maria Zanini,
que é o exemplo de que, com estudo, dedicação e comprometimento,
a realização dos sonhos é possível!*

*Obrigada por estarem sempre ao meu lado,
por me compreenderem e serem meu esteio sempre que esmoreço.
Vocês são os maiores responsáveis pela minha formação acadêmica e humana,
vocês são o sentido do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

No momento em que concluo este trabalho que espelha importante fase da minha vida, é fundamental lembrar e agradecer as pessoas que foram essenciais para sua concretização.

Primeiramente, agradeço a Deus, por ser fonte de esperança em minha vida.

Um agradecimento especial a minha orientadora, Professora Maria Rosa, pela dedicação, atenção, compreensão e apoio. A vocês, Professoras Rosa e Vera, minha eterna gratidão pela oportunidade que me deram de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pelo voto de confiança em alguém que não conheciam.

A minha co-orientadora Daniela Leal, pela oportunidade e atenção.

Agradeço a minha família amada, meu pai Dalamir, minha mãe Cleonice e minha maninha Angela, por serem meu suporte e meu porto de segurança. Amo vocês imensamente!

A minha dinda tia Idete, por torcer e acreditar em mim.

A minha IC Luana, pela disponibilidade e toda ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada, Lú!

Aos membros da banca examinadora desta dissertação, professoras Paula, Marina e Maribel, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o seu aprimoramento.

Preciso agradecer infinitamente aos meus amigos e colegas do Laboratório de Enzimologia Toxicologia (Enzitox), Beta, Carol, Déia, Juci, Victor, Jéssica, Marga, Gustavo, Rose e Jessié, pelo carinho, pelas palavras de conforto e por sempre se mostrarem dispostos a ensinar e ajudar.

Agradeço também aos colegas Nai, Juliano, Fátima, Lizi, Javed, Pauline, Diéssica, Grasi, Rafa, Nice, Amanda, Jonas, Marília, Eduardo, Fabiano e Cláudio, pelos momentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia, Jeandre, Vivi, João e Jader, pela amizade.

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

Aos funcionários do setor de Hematologia/Oncologia do HUSM, Dr. Juarez, Maria do Carmo, Iria, Luís Eduardo, Luís Gustavo e Cláudia. Sem vocês, as coletas não seriam possíveis!

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox), pela oportunidade.

Às meninas da secretaria do PPGBTox, Angélica, Márcia e Dica, pela atenção e disponibilidade de sempre.

Ao Coordenador do PPGBTox, Gilson, e à Professora Cristina, pela atenção e apoio.

À CAPES, pela bolsa concedida.

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

O valor de poder olhar de perto como as pessoas vivem [...] está em nos oferecer uma oportunidade de, ao nos colocarmos na sua “pele”, podermos sair enriquecidos para as nossas funções, possibilitando vermos o mundo com um pouco mais de clareza.

(Martha Harris)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS E DE COLINESTERASES E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO

AUTORA: DANIELA ZANINI

ORIENTADORA: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

CO-ORIENTADORA: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de março de 2012.

O câncer de pulmão tornou-se uma das doenças neoplásicas mais comumente diagnosticadas, além de uma das mais letais em todo o mundo, caracterizando-se, portanto, como um problema de saúde pública. Essa disseminação do câncer de pulmão na população mundial, que é claramente observada em dados estatísticos, está intimamente relacionada ao consumo de tabaco, sendo o tabagismo considerado um dos principais fatores de risco que levam ao desenvolvimento de câncer desde a década de 50. Pesquisas têm demonstrado, também, que há uma estreita relação entre o consumo de cigarros, o aparecimento de eventos pró-inflamatórios e imunossupressores e o desenvolvimento de câncer de pulmão. Nesse contexto, torna-se importante o estudo das enzimas nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase), adenosina desaminase (ADA) e acetilcolinesterase (AChE), que estão envolvidas no controle dos processos inflamatórios e na regulação dos eventos imunológicos, sendo que alterações nas suas atividades têm sido observadas em várias doenças, incluindo o câncer. Trabalhos revelam, ainda, que o estresse oxidativo está intimamente associado ao desenvolvimento e à progressão de neoplasias, razão pela qual é extremamente relevante a avaliação desses aspectos das funções celulares em um grupo de pacientes com câncer de pulmão. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a atividade da NTPDase e a sua expressão (CD39) em linfócitos, da ADA e da butirilcolinesterase (BChE) em soro, da AChE, da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) em sangue total e o conteúdo de tióis protéicos (T-SH) e não-protéicos (NPSH) no soro de 31 pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células, atendidos no setor de Hematologia/Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria. Os resultados encontrados demonstraram um aumento significativo na atividade da NTPDase, tanto para a hidrólise do ATP, quando do ADP, em linfócitos de pacientes com câncer de pulmão. Esses resultados sugerem que os efeitos pró-inflamatórios desencadeados pelo ATP no meio extracelular podem estar diminuídos nesses pacientes. Contudo foi verificado um aumento da atividade da ADA no soro de pacientes com câncer de pulmão quando comparada com o grupo controle, fato que promove uma queda dos níveis de adenosina extracelulares. Dessa forma, sabendo-se que a adenosina apresenta propriedades anti-inflamatórias, esse aumento da atividade da ADA poderia estar proporcionando uma exacerbação dos eventos pró-inflamatórios nos pacientes alvo do estudo. Outra constatação importante foi o aumento da atividade da AChE em sangue total nos pacientes com câncer de pulmão, em comparação com o grupo controle. Essa provável redução dos níveis de acetilcolina (ACh) sanguíneos também provocaria uma diminuição da atividade anti-inflamatória característica dessa molécula. Já, quanto à atividade da SOD e da CAT, bem como quanto aos níveis de T-SH e NPSH, todos apresentaram resultados superiores no grupo de pacientes com neoplasia pulmonar quando comparados com o grupo de controle. Com isso, evidencia-se que os compostos tiólicos podem estar atuando nas reações de destoxificação e proteção dos pacientes com câncer de pulmão. Portanto, os resultados aqui descritos sugerem que o câncer de pulmão exerce uma importante alteração, tanto na atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico envolvidas nos processos inflamatórios, quanto no perfil oxidativo desses pacientes, podendo os parâmetros mencionados nesta pesquisa serem úteis na clínica médica, para o monitoramento da patologia.

Palavras-chave: Câncer de pulmão. Ectonucleotidases. Colinesterases. Estresse oxidativo. Inflamação.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ACTIVITY OF ECTOENZIMAS AND CHOLINESTERASES AND OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN PATIENTS WITH LUNG CANCER

AUTHOR: DANIELA ZANINI

ADVISER: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

CO-ADVISER: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL

Date and Place of the Defense: Santa Maria, March 2^{sd}, 2012.

Lung cancer has become one of the most commonly diagnosed neoplastic diseases, as well as one of the most lethal worldwide, characterized, therefore, as a public health problem. This spread of lung cancer in the world population, which is clearly seen in statistics, is closely related to smoking, and smoking is considered one of the main risk factors that lead to the development of cancer since the year 1950. Research has also shown that there is a close relationship between cigarette consumption, the emergence of events pro-inflammatory and immunosuppressive and the development of lung cancer. In this context, it is important to study enzyme nucleotide triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), adenosine deaminase (ADA) and acetylcholinesterase (AChE), which are involved in the control of inflammatory processes and in the regulation of immunological events, and changes in their activities have been observed in several diseases, including cancer. Studies reveal that oxidative stress is closely associated with the development and progression of cancer, being extremely important to evaluate these aspects of cellular functions in a group of patients with lung cancer. The objective of this study was to investigate the activity of NTPDase and its expression (CD39) in lymphocytes, ADA and butyrylcholinesterase (BChE) in serum, AChE, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in whole blood and the content of protein thiols (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) in the serum of 31 patients with lung cancer, non small cell, treated at the Hematology/Oncology, University Hospital of Santa Maria. The results showed a significant increase in NTPDase activity for both, hydrolysis of ATP and ADP, in lymphocytes of patients with lung cancer. These results suggest that the pro-inflammatory effects triggered by the ATP in the extracellular environment may be reduced in these patients. However there was an increase of ADA activity in serum of patients with lung cancer when compared with the control group, a fact that promotes a drop in levels of extracellular adenosine. Thus, it is known that adenosine has anti-inflammatory properties, this increase of ADA activity could be providing an exacerbation of pro-inflammatory events in targeted patients in the study. Another important finding was the increase of AChE activity in whole blood in patients with lung cancer, compared with the control group. This likely reduced levels of acetylcholine (ACh) in blood also cause a decrease in anti-inflammatory activity characteristic of this molecule. Already, as the activity of SOD and CAT as well as the levels of T-SH and NPSH, all showed superior results in patients with lung cancer when compared with the control group. Thus, it is evident that thiol compounds may be acting in detoxification reactions and protecting these patients. Therefore, the results reported here suggest that lung cancer has a significant change in the enzyme activity of purinergic and cholinergic systems involved in inflammatory processes, and the oxidative profile in these patients, and the parameters mentioned in this research be useful in clinical medicine, to monitor the disease.

Keywords: Lung cancer. Ectonucleotidases. Cholinesterases. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 –	Os múltiplos estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão	17
FIGURA 2 –	Taxas brutas de incidência de câncer estimadas para o ano 2012, por sexo, para o Estado do Rio Grande do Sul e sua capital (valor por 100 mil habitantes)	21
FIGURA 3 –	Modelo de como as células tumorais “educam” as células imunes a desempenhar funções de estímulo à progressão tumoral	29
FIGURA 4 –	Topografia de membrana das diferentes famílias de enzimas que compõem a grupo das ectonucleotidases	33
FIGURA 5 –	Topografia de membrana das ectonucleotidases	33
FIGURA 6 –	Membros da família das NTPDases	36
FIGURA 7 –	Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica	36
FIGURA 8 –	Dano oxidativo às macromoléculas biológicas	38
FIGURA 9 –	Nível de efeitos carcinogênicos <i>versus</i> nível de radicais livres nos vários estágios do processo de carcinogênese	39
FIGURA 10 –	Mecanismo enzimático antioxidante	41
QUADRO 1 –	Classificação do câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC)	22
QUADRO 2 –	Nomenclatura e preferência por substrato dos membros da família E-NTPDase em vertebrados	34

MANUSCRITO

FIGURE 1 –	NTPDase activity in the lymphocytes of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31) using ATP (A) and ADP as substrate (B). Results are expressed as mean±standard deviation.....	79
FIGURE 2 –	Percentage of CD39 positive cells from patients with lung cancer (n=10) when compared to the control group (n=10). The results were expressed as mean±standard deviation	79
FIGURE 3 –	ADA activity in the serum of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31). The results were expressed as mean±standard deviation	79
FIGURE 4 –	BChE activity in the serum of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31) (A) and AChE activity in the whole blood of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31) (B). Results are expressed as mean±standard deviation	80
FIGURE 5 –	SOD activity (A) and CAT activity (B) in the whole blood of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31). Results are	

	expressed as mean±standard deviation	80
FIGURE 6 –	T-SH levels (A) and NPSH levels (B) in serum of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31). Results are expressed as mean±standard deviation	80

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABLE 1 – Patient characteristics	75
TABLE 2 – Effect of drugs on NTPDase in lymphocytes, ADA and BChE in serum, AChE, SOD and CAT in whole blood activities from healthy subjects ..	76
TABLE 3 – Enzyme activity and characteristics of smoking patients with lung cancer correlation	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRs	– Regiões conservadas da apirase
ACS	– American Cancer Society
AChE	– Acetilcolinesterase
ACh	– Acetilcolina
ADA	– Adenosina desaminase
ADP	– Adenosina difosfato
AMP	– Adenosina monofosfato
ATP	– Adenosina trifosfato
BChE	– Butirilcolinesterase
bFGF	– Fator de crescimento de fibroblastos básico
CAT	– Catalase
CD39	– Cluster of Differentiation 39
COX-2	– Ciclooxygenase 2
CPNPC	– Carcinoma pulmonar de não pequenas células
E-NPP	– Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases
EROs	– Espécies reativas de oxigênio
GSH	– Glutathiona
HUSM	– Hospital Universitário de Santa Maria
IARC	– International Agency for Research on Cancer
IL-2	– Interleucina 2
IL-4	– Interleucina 4
IL-5	– Interleucina 5
INCA	– Instituto Nacional do Câncer
INF-γ	– Interferon γ
NF-Kβ	– Fator de necrose K β
NPSH	– Tióis não-protéicos
NTPDase	– Nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PGD2	– Prostaglandina D2
PGE2	– Prostaglandina E2
PGF 2α	– Prostaglandina 2 α
PGG2	– Prostaglandina G2

PGH2	– Prostaglandina H2
PGI2	– Prostaglandina I2
PGs	– Prostaglandinas
SOD	– Superóxido dismutase
T-SH	– Tióis protéicos
TLR	– Toll-like receptors
TNF-α	– Fator de necrose tumoral- α
TNM	– <i>tumor - node - metastasis</i>
TxA2	– Tromboxano A2
UICC	– International Union Against Cancer
UTP	– Uracila trifosfato
VEGF	– Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Questionário	100
APÊNDICE B – Dados complementares da população estudada.....	101
APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido	102

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	43
3.1 Manuscrito – Título	44
Abstract	45
Introdução	46
Material e métodos	49
Resultados	55
Discussão	58
Conclusão	65
Literatura citada – Referências bibliográficas	68
4 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES	100

1 INTRODUÇÃO

No organismo normal, o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado, para que as células constituam comunidades organizadas. No entanto, quando as células são expostas a agentes genotóxicos, sua homeostase fica comprometida, pois estão suscetíveis a um progressivo acúmulo de mutações no genoma celular (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002). Essas mutações podem ser causadas por erros durante o processo de replicação, por agentes endógenos com capacidade mutagênica, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), ou podem ser induzidas por agentes externos (BELTRÃO-BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2004).

Os agentes externos que podem provocar mutações gênicas são divididos em três classes:

- a) agentes físicos: como a luz ultravioleta e as radiações ionizantes;
- b) agentes biológicos: como alguns vírus, que se integram ao genoma celular interrompendo sequências gênicas ou promovendo rearranjos gênicos; e
- c) agentes químicos: como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas.

As alterações genéticas ocasionadas pelos agentes citados acima têm a capacidade de converter uma célula normal em uma célula maligna, que se caracteriza por não mais responder aos sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação que governam a comunidade celular (BELTRÃO-BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2004). Sendo assim, quando as células com DNA danificado escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular, instala-se o processo de carcinogênese.

De acordo com Valko et al. (2006), o processo de carcinogênese, em geral, se desenvolve lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor detectável. A carcinogênese é composta por múltiplos e distintos estágios, podendo-se destacar, entre eles, o processo de iniciação, a promoção e a progressão tumoral, cada um caracterizado por diferentes mecanismos (VALKO et al., 2006; INCA, 2012a) (Figura 1).

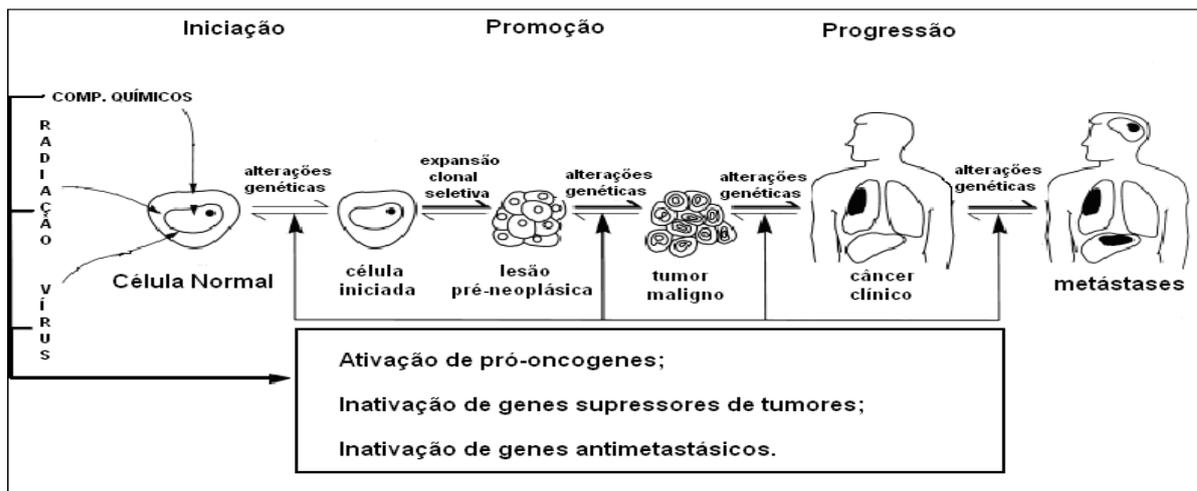


Figura 1 – Os múltiplos estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão

Fonte: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20839/>>, com adaptações.

No primeiro estágio da carcinogênese, também denominado como processo de iniciação, as células sofrem a ação de agentes mutagênicos que promovem alterações no seu conteúdo genético. Quando um fator é capaz de iniciar o processo de carcinogênese, ele é chamado de iniciador ou oncoiniciador, podendo-se citar como exemplo de agente de tal natureza o benzopireno, que é encontrado na fumaça do cigarro (SEVERO, 2008).

Vale destacar, nesse ponto, que somente uma alteração no DNA não é suficiente para causar o câncer, sendo necessárias várias mutações em sequência, que não sejam letais para a célula. Ressalte-se, ainda, que as mutações responsáveis pelo desenvolvimento do câncer ocorrem preferencialmente em duas classes de genes: nos genes supressores de tumores (elementos genéticos cuja perda ou inativação permite à célula apresentar algum dos vários fenótipos da transformação neoplásica) e nos oncogenes (genes que codificam proteínas que promovem a perda do controle sobre o ciclo mitótico e levam as células a se tornarem cancerosas) (TENEN, 2003).

No segundo estágio da carcinogênese, denominado fase de promoção, as células geneticamente alteradas, ou iniciadas, sofrem a ação de fatores que estimulam a sua multiplicação, designados de agentes promotores ou oncopromotores, que fomentam a transformação de uma célula iniciada em uma célula maligna. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio, contudo alguns componentes da alimentação,

como gorduras, e também a exposição excessiva e prolongada a hormônios são fatores que favorecem a transformação de células iniciadas em células malignas. Por derradeiro, tem-se o processo de progressão tumoral, que é caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio, o câncer está instalado e as primeiras manifestações clínicas da doença surgem (INCA, 2012b).

Fixadas essas premissas, torna-se importante conhecer o microambiente que abriga as células tumorais. Trata-se de um meio formado basicamente pelas próprias células tumorais epiteliais e estromais; pelas células imunes, como as células *natural killer* (NK), as células dendríticas, os linfócitos T e B e os macrófagos; e pelas citocinas produzidas por essas células. Esses componentes celulares estão imersos no estroma, que é composto pela matriz extracelular e seus constituintes, como proteoglicanas, colágenos, glicoproteínas e outras células (tais como células adiposas e fibroblastos), além de vasos sanguíneos (FRANCO et al., 2010).

No que diz respeito aos vasos sanguíneos que compõem esse microambiente tumoral, cumpre ressaltar que as células cancerosas, à semelhança das células normais, necessitam de oxigênio para sobreviver. A angiogênese, que é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de uma vascularização pré-existente, é um evento comum e fundamental durante o processo de desenvolvimento neoplásico (KUMAR et al., 2010).

A vascularização dos tumores é efetuada pela liberação de fatores angiogênicos associados ao tumor, derivados de células tumorais ou de células inflamatórias, como os macrófagos que penetram nos tumores, sendo que os dois fatores angiogênicos tumorais mais importantes são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) (SOUZA, 2011).

Além dos fatores angiogênicos, as células tumorais ou as células do hospedeiro também produzem fatores antiangiogênicos, que incluem a angiostatina, a endostatina e a vasculostatina. O crescimento dos tumores é controlado, então, pelo equilíbrio entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos, tendo estes últimos sido estudados terapêuticamente para retardar o crescimento tumoral (KUMAR et al., 2010).

As primeiras evidências científicas para essa doença foram encontradas em tumores ósseos fossilizados de múmias no Egito, datando de 3000 a.C. Muito

interessante é que, já nessa época, se relatava o que hoje é ainda em parte verdade: “não há tratamento para essa doença” (SOUZA, 2011). Até então, não se designava a palavra “câncer” para essa doença tão temida. Foi o médico grego Hipócrates (470 – 310 a.C.), “Pai da Medicina”, o criador dos termos *carcinos* e *carcinoma* para descrever tumores ulcerados ou não. Essas palavras significam, em grego, caranguejo, fazendo uma analogia entre o crescimento infiltrativo do câncer, formando projeções como as pernas de um caranguejo. Coube, então, ao romano Celsus (28 – 50 a.C.) a tradução da palavra para o latim: *câncer* (SOUZA, 2011).

Dados mostram que o número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável, principalmente a partir do século passado, configurando-se como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005). Segundo a *American Cancer Society* (ACS, 2011), cerca de metade dos homens e um terço das mulheres do mundo vão desenvolver câncer em algum período da sua vida.

Levantamentos realizados pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer - *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estimaram aproximadamente 12,7 milhões casos de câncer e 7,6 milhões de mortes por câncer para o ano de 2008 em todo o mundo. Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivendo, anualmente, com câncer, incidindo o maior efeito desse aumento em países de baixa e média rendas (INCA, 2012c).

No Brasil, as estatísticas para 2012 demonstram que são esperados um total de 257.870 novos casos de câncer para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa de que o câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira (com 134 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2012c).

As pesquisas também associam os prováveis novos casos de câncer no ano de 2012 ao gênero da população brasileira. Avalia-se que os 5 tumores mais incidentes para o sexo masculino serão o câncer de pele não melanoma (63 mil casos novos), de próstata (60 mil), de pulmão (17 mil), de cólon e reto (14 mil) e de estômago (13 mil). Para o sexo feminino, destacam-se, entre os 5 mais incidentes,

os tumores de pele não melanoma (71 mil casos novos), de mama (53 mil), de colo do útero (18 mil), de cólon e reto (16 mil) e de pulmão (10 mil) (INCA, 2012c).

Os estudos ainda revelam que a distribuição dos novos casos de câncer, levando-se em conta o tipo de tumor e as cinco regiões do país, para o sexo masculino, mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste, as menores (INCA, 2012c).

É nesse cenário que o câncer de pulmão, de doença rara no início do século XX, tornou-se uma das doenças neoplásicas mais disseminadas (PARKIN et al., 2001; ZAMBONI, 2002; WANG et al., 2010). Pesquisas recentes têm evidenciado que o câncer de pulmão é a doença neoplásica mais comumente diagnosticada, bem como a principal causa de morte por câncer nos homens em todo o mundo. Entre as mulheres, foi o quarto sítio de câncer mais frequentemente diagnosticado e a segunda principal causa de morte por neoplasia (JEMAL, 2011).

No Brasil, dados apontam que, entre os homens, de 1986 a 2007, as neoplasias de traquéia, brônquios e pulmões levaram a óbito um maior número de pacientes, sendo que o Rio Grande do Sul é um dos estados brasileiros com os maiores índices de mortalidade para essa patologia (BRASIL, 2010).

Considerando, ainda, as estimativas antes referidas acerca do incremento dos casos de câncer de pulmão no Brasil no ano de 2012, pode-se dizer que os valores apontados correspondem a um risco provável de 18 casos novos a cada 100 mil homens e 10 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012c).

Ressalte-se, ainda, que, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do pulmão em homens é o segundo mais frequente nas regiões Sul (37/100 mil) e Centro-Oeste (17/100 mil), ocupando, nas regiões Sudeste (20/100 mil), Nordeste (8/100 mil) e Norte (8/100 mil), a terceira posição no *ranking* de incidência. Quanto às mulheres, é o terceiro mais frequente na região Sul (19/100 mil), o quarto na região Centro-Oeste (9/100 mil) e o quinto nas regiões Sudeste (11/100 mil), Nordeste (6/100 mil) e Norte (5/100 mil) (INCA, 2012c).

As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) quanto à incidência de câncer, no ano de 2012, para o Estado do Rio Grande do Sul (Figura 2), vão ao encontro dos índices apontados acima.



Figura 2 – Taxas brutas de incidência de câncer estimadas para o ano 2012, por sexo, para o Estado do Rio Grande do Sul e sua capital (valor por 100 mil habitantes)

Fonte: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=RS>>.

Quanto à origem das neoplasias pulmonares, a literatura aponta que estão relacionadas às células que revestem os alvéolos do parênquima pulmonar ou à mucosa da árvore traqueobrônquica (EDGE et al., 2010). Sendo assim, o câncer de pulmão não é uma doença com comportamento uniforme, pois engloba diversos tipos histológicos, com atividade biológica e agressividade diferentes. A principal subdivisão proposta no que concerne às características anatomopatológicas para os tumores de pulmão são: carcinoma indiferenciado de pequenas células e carcinoma de não pequenas células (CPNPC), que correspondem a 20% e 80% dos casos, respectivamente. O CPNPC inclui os subtipos adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermóide) e carcinoma de grandes células, sendo que o adenocarcinoma atualmente é o tipo histológico mais comum (ALBERG; BROCK; SAMET, 2005).

A avaliação da extensão (estadiamento) do CPNPC é realizada pelo sistema *tumor - node - metastasis* (TNM), desenvolvido por Pierre Denoix, entre os anos de 1943 e 1952, e publicado pela *International Union Against Cancer* (UICC). Esse sistema utiliza critérios de classificação que estão ligados ao tamanho e à posição do tumor primário (T), à presença e localização de linfonodos comprometidos (N) e à presença de metástases a distância (M), sendo operacionalizado por meio de exames de imagem e eventual biópsia de linfonodos e mediastino. O objetivo principal da classificação do estadiamento dos tumores é estimar a extensão anatômica da doença e, a partir daí, associar esses dados ao tratamento e à sobrevida dos pacientes (FERNANDES; JATENE; ZAMBONI, 2002).

Na interpretação de cada fator, são analisadas as diversas variações que, para o tumor primitivo, vão de T1 a T4; para o comprometimento linfático, de N0 a N3; e para as metástases, de M0 a M1 (SANTOS, 2011) (Quadro 1).

Tumor primário (T):
TX – O tumor primário não pode ser avaliado ou tumor comprovado por presença de células malignas no escarro ou lavado brônquico mas não visualizado no broncoscopia ou nos exames de imagem.
Tis – Carcinoma in situ.
T0 – Sem evidência de tumor primário.
T1 – Tumor menor ou igual a 3 cm em sua maior dimensão, envolvido por pulmão ou pela pleura visceral, sem evidência broncoscópica de invasão mais proximal do que o brônquio lobar.
T2 – Tumor com mais de 3 cm ou qualquer uma das seguintes características: envolvimento do brônquio principal, distante ≥ 2 cm da carina; invasão da pleura visceral; associado à presença de atelectasia ou pneumonia obstrutiva que se estende à região hilar, mas não compromete todo o pulmão.
T3 – Tumor de qualquer tamanho com invasão direta de qualquer uma das seguintes estruturas: parede torácica (incluindo tumores de sulco superior), diafragma, pleura mediastinal, pericárdio parietal; tumor no brônquio principal a uma distância da carina menor que 2 cm, mas sem envolvê-la; associado à atelectasia ou pneumonia obstrutiva de todo o pulmão; ou presença de nódulos tumorais localizados no mesmo lobo do tumor primário.

T4 – Tumor de qualquer tamanho, com invasão direta de qualquer uma das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina; ou presença de nódulos tumorais localizados em um lobo diferente do tumor primário, mas ipsilateral ao tumor primário.			
Linfonodos regionais (N):			
NX – Linfonodos regionais não podem ser avaliados.			
N0 – Ausência de metástases nos linfonodos regionais.			
N1 – Metástases para linfonodos peribrônquicos e/ou hilares ipsilaterais e/ou intrapulmonares incluindo o envolvimento desses por invasão direta do tumor primário.			
N2 – Metástases para linfonodos mediastinais ipsilaterais e/ou linfonodos carinais.			
N3 – Metástases para linfonodos mediastinais contralaterais, hilares contralaterais, escalenos ipsilaterais ou contralaterais ou linfonodos supraclaviculares.			
Metástases a distância (M):			
MX – Presença de metástases a distância não pode ser avaliada.			
M0 – Ausência de metástases a distância.			
M1 – Presença de metástases a distância.			
M1a – Nódulos em um lobo contralateral ao tumor primário, com nódulos pleurais ou derrame pleural (ou pericárdico) maligno.			
M1b – Metástases a distância.			
Agrupamento por estágio:			
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
IIIA	T1/T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IB	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIB	qualquer T	N3	M0

	T4	qualquer N	M0
IV	qualquer T	qualquer N	M1

Quadro 1 – Classificação do câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC)
Fonte: SANTOS, R. dos, 2011.

O câncer de pulmão geralmente é detectado em estágios avançados devido à ausência de sintomatologia nos estágios iniciais da doença. Em decorrência disso, permanece como uma doença altamente letal (MORA, 2004). Estima-se que, no momento do diagnóstico do CPNPC, 20% dos pacientes têm doença localizada, 25% têm extensões da neoplasia para os linfonodos mediastinais e 55% já apresentam metástases a distância (SOUZA, 2011).

Apesar dos investimentos em pesquisa de novos tratamentos, a sobrevida no câncer de pulmão ainda é baixa: apenas 14% dos pacientes permanecem vivos após 5 anos do diagnóstico, principalmente quando comparado com as taxas de sobrevida de outras neoplasias como de cólon (63%), mama (85%) e próstata (93%). Muitos fatores prognósticos têm sido associados à variação de sobrevida em pacientes com câncer de pulmão como a extensão anatômica da doença, o estado geral do paciente, o gênero, a idade, o tipo celular, a exposição cumulativa aos agentes ambientais carcinogênicos, a predisposição genética entre outros (MORA, 2004).

Em relação ao tratamento a que os pacientes com neoplasia pulmonar são submetidos, recomenda-se cirurgia ou radioterapia para os indivíduos com doença localizada, que correspondem somente a 20% dos casos, e para os pacientes com CPNPC que apresentam metástases a indicação é o tratamento quimioterápico (SOUZA, 2011).

Essa disseminação do câncer de pulmão na população mundial, que é claramente observada pelos dados estatísticos, está intimamente relacionada com o consumo de tabaco nas comunidades (IARC, 2004). O tabagismo é caracterizado como um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento de câncer desde a década de 50 (SASCO; SECRETAN; STRIF, 2004) e cada vez mais estudos epidemiológicos têm sido desenvolvidos em resposta a essa plausível correlação.

Pesquisas apontam o fumo como sendo o responsável por quase 90% dos casos de câncer de pulmão diagnosticados. Segundo estimativa do INCA, para o

ano de 2002, ele foi responsável por 21.425 casos de câncer de pulmão e 15.955 mortes associadas a este diagnóstico.

É importante salientar aqui que o risco de morte por câncer de pulmão é de 7 a 14 vezes maior entre os fumantes do que entre os não fumantes (JAMNIK, 2012), razão pela qual Zander et al. (2008) afirmam que *“o câncer de pulmão é uma doença primeiramente ambiental”*.

No tabaco, já foram identificadas mais de 4.000 substâncias tóxicas e cerca de 60 elementos potencialmente cancerígenos que o usuário do produto absorve no seu organismo (MACKAY; ERIKSEN, 2002). Só na fumaça do cigarro podem ser identificadas em torno de 200 aminas, bem como dezenas de diferentes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, metais, como o níquel, o cádmio e o chumbo, além de diversas amônias, cetonas e cetaldeídos (BOING; PERES; ANTUNES, 2002; ZANDER et al., 2008). A interação dos metabólicos ativos oriundos desses agentes carcinogênicos com o DNA das células pode provocar severas alterações fenotípicas, evento crítico para o desenvolvimento de tumores (CAVENARI; ROGATTO, 2004).

É importante destacar que as alterações que as indústrias fumageiras vêm realizando, ao longo dos anos, na composição dos cigarros também favoreceram a maior incidência de neoplasias pulmonares do tipo histológico adenocarcinoma na atualidade. A redução do teor de nicotina dos cigarros contribuiu para uma diminuição dos casos de carcinoma de pequenas células, enquanto o acréscimo dos níveis de nitrato nos cigarros, mudança que propicia um aumento dos teores de nitrosaminas produzidas durante o ato de fumar, é provavelmente o responsável pelo aumento na incidência de adenocarcinomas entre a população tabagista (ALBERG; BROCK; SAMET, 2005).

Vale salientar, também, que, na relação entre tabagismo e incidência de câncer, deve-se levar em conta a quantidade de tabaco consumido e o tempo de duração do hábito de fumar, estabelecendo-se um binômio dose-resposta (MACFARLANE et al., 1995; GARROTE et al., 2001).

Os danos ao organismo humano provenientes do tabagismo não afetam apenas as pessoas que fumam, mas também atingem as não fumantes, que vivem sob a poluição proveniente da fumaça de cigarros nos domicílios, nos ambientes de trabalho e de lazer. A poluição ambiental decorrente da fumaça exalada pelo fumante (caracterizada como corrente primária ou principal) corresponde a 25% do total de

poluição dispersada; já aquela proveniente da queima da ponta do cigarro e de outros produtos do tabaco (caracterizada como corrente secundária), corresponde aos 75% restantes da poluição ambiental proveniente do hábito de fumar. Ressalte-se que a corrente secundária é a mais importante fonte de poluição ambiental e aquela que apresenta as maiores concentrações de todos os componentes carcinogênicos constituintes do tabaco (ARAÚJO, 2007).

Assim, a fumaça inalada pelos fumantes passivos ou involuntários será responsável por grande parte das doenças tabaco-relacionadas neles incidentes, em particular, o câncer de pulmão (HACKSHAW; LAW; WALD, 1997; MIRRA, 2007). Entretanto há outros fatores que também favorecem o desenvolvimento de câncer de pulmão, como, por exemplo, a poluição atmosférica, os asbestos e outras fibras minerais, a sílica e os fatores genéticos (MENEZES et al., 2002; ZAMBONI, 2002; GUIMARÃES, 2006; COTE et al., 2009).

É por isso que estudos têm sugerido que as neoplasias podem ser originadas em sítios expostos cronicamente a agentes irritantes e que os processos inflamatórios presentes nesses sítios também podem ser os responsáveis pela origem de tumores (HUANG; CHEN, 2011).

As pesquisas recentes demonstram que o consumo de cigarros promove significativos efeitos pró-inflamatórios, por meio da estimulação da expressão da enzima ciclooxygenase 2 (COX-2) em uma grande variedade de células, como em células T, em células neoplásicas pulmonares e em células escamosas de cabeça e pescoço (HUANG; CHEN, 2011). Desse modo, a estimulação da COX-2 pelo tabagismo pode ser um dos caminhos para o desenvolvimento dos processos inflamatórios em fumantes, fato que contribui significativamente para o desenvolvimento e evolução das doenças neoplásicas nesses indivíduos.

Em reforço a essa tese está o fato de que diversos autores relataram uma significativa expressão da COX-2 em diferentes neoplasias, como câncer de pulmão (HIDA et al., 1998), de esôfago (WILSON et al., 1998) e de mama (HARRIS et al., 2000), o que sugere que essa proteína possa participar de passos importantes durante os processos de carcinogênese.

A COX-2 é responsável pela conversão do ácido araquidônico em eicosanóides, como as prostaglandinas (PGs) (HASTÜRK et al., 2002). A via ciclooxygenase leva à formação das prostaglandinas PGG₂ e, em sequência, das PGH₂ e, a partir delas, há formação dos seus derivados biologicamente ativos, quais

sejam, as prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF₂α, PGI₂ (prostaciclina) ou TxA₂ (tromboxano A₂) (SMITH, 1992; VANE; BOTTING, 1998; SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000).

Entre as PGs, a PGE₂ é uma das biomoléculas mais extensamente estudadas em relação ao seu potencial envolvimento na progressão tumoral, já que ela exerce uma série de efeitos inibitórios no sistema imunológico, podendo afetar os processos de diferenciação e proliferação celular (RÖSCH et al., 2005; HARRIS, 2009).

Como citado anteriormente, a fumaça do cigarro induz o aumento da expressão da COX-2, elevando, dessa maneira, a liberação de PGE₂ a partir de muitos tipos celulares, como fibroblastos (MARTEY et al., 2004; WANG; HONN; NIE, 2007), monócitos sanguíneos (MARTEY et al., 2005), macrófagos alveolares (BELOQUI et al., 2005; PROFITA et al., 2010), células dendríticas pulmonares (HWANG et al., 1999) e neutrófilos (BELOQUI et al., 2005), sendo que a maioria deles faz parte do sistema imunológico.

As PGs liberadas pelas células mencionadas acima desencadeiam, então, uma série de eventos relacionados à manutenção de um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral, já que elas atuam sobre a produção do fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e sobre a produção de citocinas (HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008), além de estimularem os mecanismos de angiogênese.

De acordo com Gately (2000), a angiogênese pode ser induzida pela COX-2 através: a) do estímulo à expressão de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); b) da geração de produtos dos eicosanóides, como tromboxanos A₂, PGE₂ e PGI₂, que diretamente estimulam a migração endotelial; e c) da inibição da apoptose endotelial.

No entanto, as pesquisas desenvolvidas em torno dos mecanismos que envolvem a COX-2 e a PGE₂ como facilitadoras do desenvolvimento de tumores expõem um paradoxo intrigante, já que, por um lado, a COX-2 e PGE₂ causam a progressão da carcinogênese através de seus efeitos pró-inflamatórios (MARTEY et al., 2004), enquanto, por outro lado, há uma promoção do crescimento do tumor por ações de imunossupressores que facilitam que as células tumorais escapem da vigilância imunológica (HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008; WANG; DUBOIS, 2010). Isso acontece porque a PGE₂ pode atuar como agente pró e anti-inflamatório. Percebe-se, portanto, que há uma relação estreita entre o consumo de

cigarros, o aparecimento de eventos pró-inflamatórios e imunossupressores e o desenvolvimento de câncer de pulmão.

As doenças pulmonares crônicas, como as doenças neoplásicas, são caracterizadas, então, pela inflamação tecidual persistente e pela remodelação do tecido, fatos que contribuem para um declínio progressivo da função pulmonar (SIME, 2001). Uma característica comum desses distúrbios é o recrutamento e ativação de células efetoras, tais como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, células epiteliais e linfócitos, que liberam mediadores capazes de promover uma inflamação adicional (THANNICKAL et al., 2004).

Os linfócitos são células sanguíneas originadas na medula óssea a partir de um único precursor hematopoético comum (*Stem cell*, ou célula indiferenciada pluripotente). Eles são leucócitos do tipo agranulócitos presentes no sangue em quantidades que variam sob as condições fisiológicas (como idade e sexo) e que correspondem a cerca de 30% (trinta por cento) das células circulantes do sangue, sendo as principais células envolvidas no reconhecimento e destruição de antígenos não-próprios ou prejudiciais ao organismo (LORENZI, 2003).

Após a diferenciação, os linfócitos sofrem o processo de maturação final, que pode ocorrer na própria medula óssea ou em outro tecido. As células maduras, de acordo com seu papel fisiológico, podem ser classificadas como linfócitos T, que sofrem maturação no timo, e linfócitos B e NK, os quais, no homem, sofrem maturação na medula óssea (LÉCUYER HOANG, 2004; BLOM; SPITS, 2006).

Os linfócitos T são encarregados da imunidade mediada por células, subdividindo-se em linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), que, quando ativados, atuam eliminando células infectadas, e em linfócitos T *helper* ($CD4^+$), que atuam secretando citocinas reguladoras do sistema imune. As células $CD4^+$ podem, ainda, ser dos tipos Th1 e Th2, de acordo com o tipo de citocinas que produzem. As células Th1 secretam interleucina 2 (IL-2), responsável pela ativação de células $CD4^+$ e $CD8^+$, e interferon γ (INF- γ), que ativa macrófagos; já as Th2 secretam IL-4 e IL-5, que induzem a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (ADAM; ODHAV; BHOOLA, 2003).

Os mecanismos que correlacionam imunidade inata, inflamação e câncer ainda são pouco claros, porém estudos apontam que a produção de citocinas pelas células imunes ativadas e a ativação de *toll-like receptors* (TLRs) presentes nas células tumorais podem mediar a comunicação entre os diferentes sistemas. De fato,

os TLRs são um componente da resposta imune inata e a sua expressão tem sido relacionada com o aumento da malignidade e da resistência à quimioterapia e à radioterapia em diversos tipos tumorais (CHEN et al., 2008). Em geral, a ativação de TLRs culmina na indução de fator nuclear- κ B (NF- κ B) e na consequente produção de citocinas pró-inflamatórias que estimulam o avanço tumoral (SHISHODIA; AGGARWAL, 2002; PIKARSKY et al., 2004).

Há uma teoria que sugere que células tumorais podem modular a resposta imune ao seu favor por meio da secreção de citocinas. O modelo proposto por Chen e colaboradores (2008) revela que as células tumorais, através da produção de citocinas, recrutam células imunes para o microambiente tumoral e essas células imunes “diferenciadas”, então, são induzidas pelas células neoplásicas a desempenhar funções de suporte e progressão tumoral através da produção de citocinas (Figura 3).

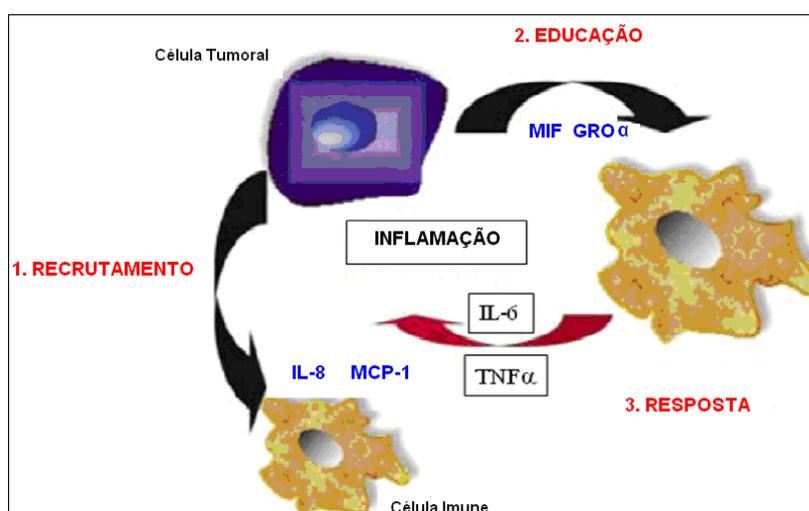


Figura 3: Modelo de como as células tumorais “educam” as células imunes a desempenhar funções de estímulo à progressão tumoral
Fonte: CHEN et al. (2008), com adaptações.

A influência das citocinas também é extremamente importante no processo de angiogênese desenvolvido durante a progressão tumoral, verificando-se, portanto, o envolvimento dessas moléculas pró-inflamatórias nos 3 (três) passos da carcinogênese, referidos no início desta exposição: a iniciação, a promoção e a progressão tumoral.

Ante o exposto, fica evidente a íntima relação das células imunes com os processos inflamatórios observados durante o desenvolvimento e progressão das

doenças neoplásicas, tornando fundamental demonstrar a importância que uma classe de moléculas sinalizadoras tem nesses processos: os nucleotídeos ATP, ADP e AMP e o seu nucleosídeo correspondente, a adenosina (YEGUTKIN et al., 2002).

Apesar de tradicionalmente serem atribuídas aos nucleotídeos ações estritamente intracelulares, atualmente está bem estabelecido o conceito de que essas moléculas também atuam como mensageiros extracelulares, capazes de sinalizar uma série de efeitos biológicos (BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2007). Entre esses efeitos biológicos, é de suma importância destacar aqueles relacionados ao sistema de sinalização purinérgica no controle das respostas imunes e inflamatórias.

Como já mencionado anteriormente, há uma estreita relação entre a ocorrência de processos inflamatórios e o desenvolvimento de tumores, tendo sido relatado, também, que a transformação de uma célula normal em uma célula maligna é um processo multifatorial que requer condições específicas que disponibilizem um suporte fisiológico para o desenvolvimento do tumor. Devido à habilidade que os nucleotídeos extracelulares têm em atuar como fatores indutores de crescimento e proliferação celular (RATHBONE et al., 1999), muitos estudos têm apontado que a sinalização purinérgica pode estar envolvida com a progressão tumoral (WHITE; BURNSTOCK, 2006).

Os nucleotídeos, tais como o ATP, o ADP e o UTP, estão presentes nos fluídos extracelulares em baixas quantidades (concentrações micromolares), havendo uma extensa discussão em torno das vias celulares envolvidas na sua liberação para o meio extracelular, uma vez que o exato mecanismo desse processo ainda não está completamente esclarecido (BURNSTOCK, 2008). Sabe-se, contudo, que a concentração desses nucleotídeos no meio exterior ao da célula é influenciada por vários fatores, como secreção e/ou lise celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática, exocitose de vesículas secretoras (tais quais os corpos densos plaquetários), diluição desses nucleotídeos no espaço extracelular (ENJYOJI et al., 1999; ZIMMERMANN, 2001) e os efeitos da ação catalítica de enzimas do tipo NTPDases (nucleotidases) (MALMSJO; EDVINSSON; ERLINGUE, 2000).

Uma vez liberados, os nucleotídeos interagem com receptores purinérgicos específicos, mediando eventos de resposta imune, de inflamação, de agregação plaquetária, entre outros (BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2007). Esses receptores são divididos em duas subfamílias: aqueles acoplados à proteína G (P2Y) e

aqueles ligados a canais iônicos (P2X), sendo que, em mamíferos, já foram identificados oito tipos de receptores P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) e sete tipos de receptores P2X (P2X₁ – P2X₇) (BURNSTOCK, 2006). A sinalização purinérgica é finalizada, então, pela ação de ectoenzimas que hidrolisam os nucleotídeos até os seus respectivos nucleosídeos, no meio extracelular (ZIMMERMANN, 1994).

Os nucleotídeos, especialmente o ATP, atuam como moléculas sinalizadoras endógenas de injúrias, desencadeando uma resposta do sistema imune (ZHANG; MOSSER, 2008). Estudos revelam que o ATP está envolvido em diversas funções no sistema imune: nas células T, o ATP é capaz de mediar a resposta imune atuando como um agente pró-inflamatório, porque estimula a proliferações de linfócitos e potencializa a liberação de citocinas, como a IL-2 e o IFN- γ (LANGSTON et al., 2003; BOURS et al., 2006); nos monócitos circulantes, o ATP está envolvido no recrutamento destes para os tecidos alvo (VENTURA; THOMOPOULOS, 1995); nas células dendríticas, o ATP induz migração e diferenciação (LA SALA et al., 2003); nos macrófagos, estimula a produção de IL-1 β (ELSSNER et al., 2004) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (GUERRA et al., 2003).

Para que se entenda melhor o envolvimento da sinalização purinérgica com o desenvolvimento neoplásico, os receptores purinérgicos denominados como receptores do tipo P2 devem ser destacados. A literatura relata o receptor P2X₇, também conhecido como P2Z (DI VIRGILIO et al., 2001), como sendo um dos receptores purinérgicos mais estudados em uma série de patologias, inclusive no câncer (BURNSTOCK, 2008). Tudo isso se deve à sua peculiar habilidade de sofrer uma progressiva alteração no seu formato, induzida pelo ATP, o que pode levar à geração de um poro não seletivo na membrana.

A presença do receptor P2X₇ já foi descrita em diversas células, tais como macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos. Intrigante é o fato de que a ativação deste receptor pelo ATP, dependendo das concentrações extracelulares, é capaz de induzir dois efeitos antagônicos: proliferação celular, quando em baixas concentrações, e morte celular via necrose ou apoptose, quando em altas concentrações (DI VIRGILIO, 2000; ADINOLFI et al., 2005).

Esse receptor é também um dos principais mediadores da resposta inflamatória induzida pelo ATP, o que pode ter consequências importantes no que

tange ao avanço tumoral. Estudos recentes *in vivo* demonstraram que o ATP se acumula na periferia dos tumores, podendo modular uma série de sinalizações que controlam a resposta inflamatória e que estimulam a proliferação tumoral (BRAGANHOL, 2010).

Apesar de as funções do ATP sobre os linfócitos durante os processos de inflamação e carcinogênese estarem, em parte, elucidadas, as funções do ADP não estão perfeitamente esclarecidas (LUTHJE, 1989), muito embora este nucleotídeo seja um importante estimulante da agregação plaquetária, ativando e recrutando plaquetas para o sítio da injúria tecidual (MARCUS et al., 2003).

Além dos nucleotídeos ATP e ADP, o seu nucleosídeo correspondente, a adenosina, também é considerado uma molécula sinalizadora de dano celular, porém com ações contrárias às do ATP (BOURS et al., 2006). A adenosina medeia uma resposta imunossupressora e anti-inflamatória, atuando como agente protetor dos tecidos saudáveis contra os ataques promovidos pelas células de defesa.

Entre as ações imunes da adenosina, estão incluídas a promoção da maturação dos monócitos (FISCHER et al., 1976; KAWASHIMA et al., 2000; SPYCHALA, 2000; DUNWIDDIE; MASINO, 2001), a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- γ) (HASKÓ et al., 2009), a inibição da adesão de linfócitos a respostas inflamatórias (ODASHIMA et al., 2005) e a inibição da proliferação de células T (SPYCHALA, 2000; GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007).

Todavia existem controvérsias sobre os efeitos benéficos da adenosina, havendo relatos, na literatura, de que ela apresenta propriedades pró-carcinogênicas, entre as quais se destacam as funções promotoras de crescimento tumoral, de estímulo à angiogênese e de redução da hipóxia tecidual, através de sua atividade vasodilatadora, fatos que podem agravar ainda mais o estado de saúde dos pacientes que já apresentam câncer de pulmão (RATHBONE, 1992; SPYCHALA, 2000; GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007).

Consoante já referido, a concentração dos nucleotídeos extracelulares pode ser modulada pela atividade de enzimas denominadas ectonucleotidases. Nesse processo, diferentes famílias de ectoenzimas trabalham de forma orquestrada, dentre as quais estão incluídas as ectonucleosídeo trifosfato-difosfoidrolases (E-NTPDase), as ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP), as ecto-5'-nucleotidase e as fosfatases alcalinas (ZIMMERMANN 2001; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006) (Figura 4).

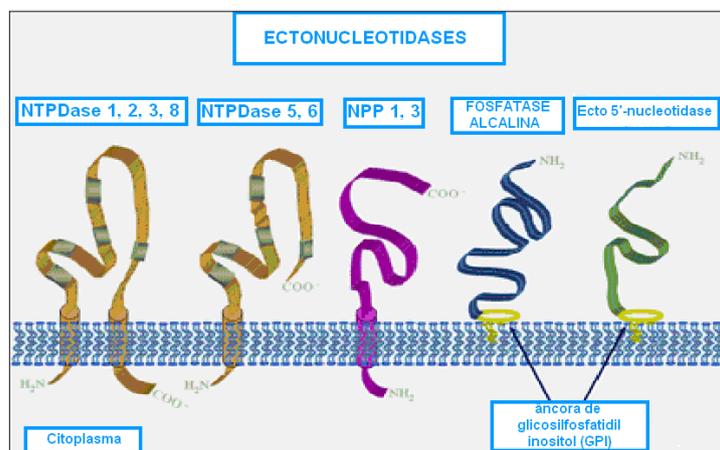


Figura 4: Topografia de membrana das diferentes famílias de enzimas que compõem o grupo das ectonucleotidasas

Fonte: <www.crrri.ca/sevigny.html>, com adaptações.

Neste estudo, dar-se-á enfoque às E-NTPDases, que constituem uma classe de ectoenzimas ancoradas à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos, com o sítio ativo voltado para o meio extracelular. Essas enzimas são caracterizadas pela sua capacidade de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001), pela sua dependência de cátions divalentes para exercer sua atividade catalítica (PLESNER, 1995) e por apresentarem um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões, conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs) as quais são extremamente importantes para a atividade catalítica (ZIMMERMANN, 1999) (Figura 5).

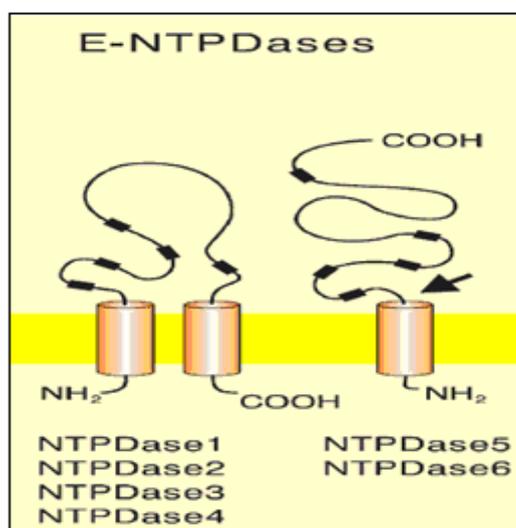


Figura 5: Topografia de membrana das ectonucleotidasas

Fonte: ZIMMERMANN (2001), com adaptações.

Já foram identificados oito membros da família das E-NTPDases, quais sejam, NTPDase 1 a 8, sendo que cada uma delas difere entre si quanto à especificidade ao substrato (Quadro 2), à distribuição tecidual e à localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIOGENNESE et al., 2004).

Nomenclatura atual	Preferência por substrato
NTPDase 1	ATP=ADP (1:1)
NTPDase 2	ATP>>>>ADP (30:1)
NTPDase 3	ATP>ADP (3:1)
NTPDase 4	UDP>GDP, CDP
NTPDase 5	UDP>GDP, IDP>>>ADP, CDP
NTPDase 6	GDP>IDP>>UDP, CDP>>ADP

Quadro 2 – Nomenclatura e preferência por substrato dos membros da família E-NTPDase em vertebrados

Fonte: ZIMMERMANN (2001), com adaptações.

As NTPDases 1, 2, 3 e 8 são ligadas à membrana da superfície plasmática por meio de dois domínios transmembrana N e C-terminal citoplasmáticos, apresentam o sítio catalítico voltado para a face extracelular e são as principais responsáveis pela metabolização dos nucleotídeos no meio extracelular. As NTPDase 4, 5, 6 e 7, por sua vez, exibem localização intracelular (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006) (Figura 6).

A identidade molecular do primeiro membro da família das E-NTPDases, a NTPDase 1 (ATP difosfohidrolase, Apirase, EC 3.6.1.5, CD39), foi revelada somente na metade da década de 90. Estudos posteriores mostraram que a NTPDase 1 é abundantemente expressa nos vasos sanguíneos (nas células endoteliais e nas células musculares lisas), nas células dendríticas, nos linfócitos e em uma variedade de outras células (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

Essa enzima tem a capacidade de hidrolisar nucleotídeos extracelulares di e trifosfatados, preferencialmente ATP e ADP (LEAL et al., 2005) e, desse modo, nos processos inflamatórios mediados por linfócitos a regulação da atividade da NTPDase poderia ser usada como marcador de ativação dos mesmos durante a resposta imune (BARANKIEWICZ; DOSCH; COHEN, 1988).

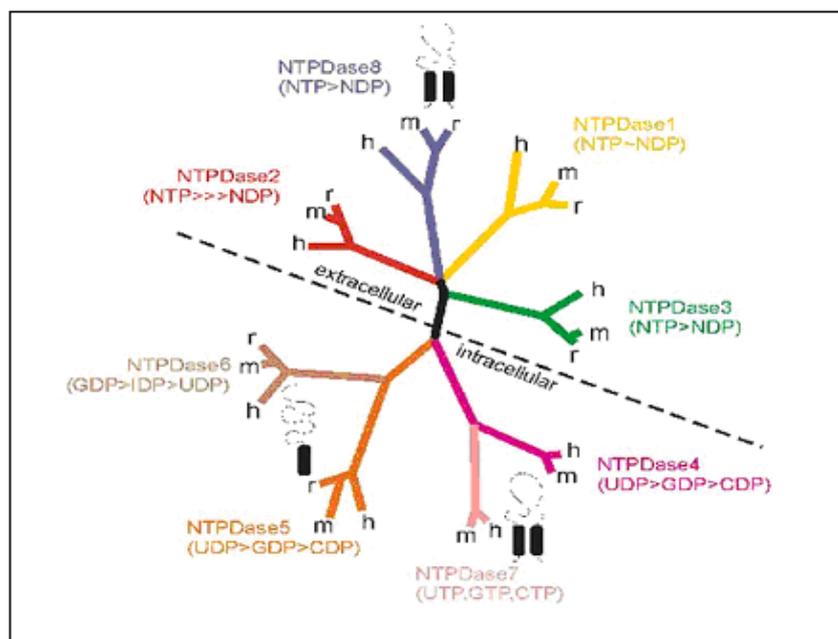


Figura 6 – Membros da família das NTPDases

Fonte: ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN (2006), com adaptações.

Além das NTPDases, a enzima adenosina desaminase (ADA – E.C.3.5.4.4) também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação sequencial dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (YEGUTKIN, 2008). Esta enzima catalisa a deaminação irreversível da adenosina e da desoxiadenosina em inosina e desoxinosina, respectivamente (BLACKBURN; KELLEMS, 2005; SPYCHALA, 2000).

Em conjunto, as ectoenzimas descritas acima são capazes de regular a concentração extracelular dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, sendo importantes sinalizadores dos eventos pró-inflamatórios, anti-inflamatórios (YEGUTKIN, 2008) e tumorais.

Além do sistema purinérgico, o envolvimento do sistema colinérgico, em especial da acetilcolina (ACh), tem sido extensamente estudado nas patologias que envolvem processos imunológicos e inflamatórios.

Por ser um neurotransmissor das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas no sistema nervoso central e periférico, a ACh é a principal molécula envolvida nas funções desse sistema. No entanto, recentes experiências envolvendo seres humanos têm documentado uma expressão ampla do sistema colinérgico também em vários tecidos não neuronais, ou seja, em células do sistema imunológico e sanguíneo (ALMEIDA; SALDANHA, 2010). Esses tecidos não neuronais possuem um sistema colinérgico completo, constituído de ACh,

receptores muscarínicos e nicotínicos, colina acetiltransferase e acetilcolinesterase (AChE).

A ação da ACh é modulada pela atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7). Essa enzima age especificamente no substrato ACh, promovendo uma inativação da ACh por hidrólise, podendo contribuir, dessa maneira, com a regulação das respostas inflamatórias através da modulação dos níveis de ACh extracelular (KAWASHIMA; FUJII, 2000; TAYEBATI et al., 2002).

A AChE possui um rico 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).

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).

O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos serina (Ser-200), histidina (His-440) e glutamato (Glu-327) (Figura 7).

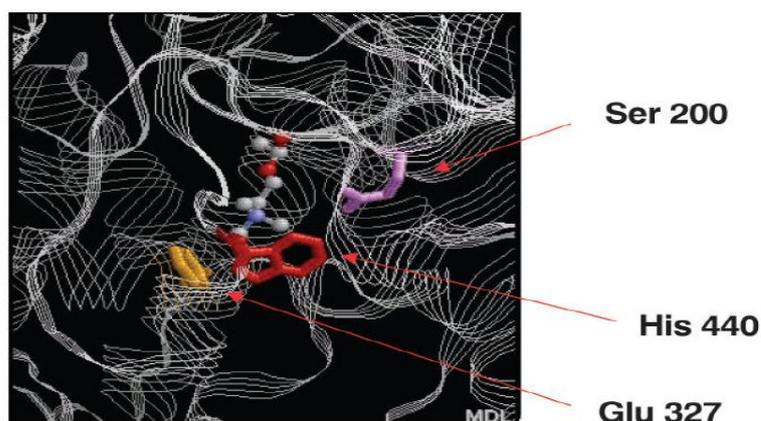


Figura 7 – Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica

Fonte: VIEGAS JÚNIOR et al. (2004), com adaptações.

A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central e também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (SILVA, 1998), sendo que, nessas células, a principal forma estrutural encontrada é a G2 (RAKONCZAY et al., 2005).

A AChE eritrocitária possui as mesmas propriedades da enzima pura presente no encéfalo (AL-JAFARI, 1995), todavia seu exato papel biológico é ainda desconhecido (KAMAL et al., 1999). Uma das funções não enzimáticas da AChE sanguínea parece estar relacionada com a diferenciação das células hematopoiéticas (SOREQ et al., 1994), além de estudos indicarem que esta enzima é um bom marcador de integridade e estado funcional da membrana (SZELENYI et al., 1987).

No sangue, a circulação de ACh pode regular várias funções fisiológicas, incluindo a modulação imunológica através da diferenciação e ativação dos linfócitos (TAYEBATI et al., 2002). Assim, a ACh sintetizada pelos linfócitos pode ter ação imunomoduladora, via receptores muscarínicos e nicotínicos, e sua propriedade anti-inflamatória torna-se evidente quando presente em concentrações elevadas, como nos processos inflamatórios (ALMEIDA; SALDANHA, 2010). Além disso, trabalhos relatam que a inibição da AChE reduz a proliferação de linfócitos, porém o mecanismo envolvido neste processo permanece desconhecido (NIZRI et al., 2005).

Por fim, cumpre ressaltar que, além do envolvimento da AChE na regulação dos níveis plasmáticos de ACh, a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) também está relacionada a esse processo. Anteriormente chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase e colinesterase não específica, ela é sintetizada no fígado e tem a capacidade de hidrolisar vários ésteres de colina, desde a ACh até a heptanoilcolina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina (WESCOE et al., 1947).

De outro vértice, sabe-se que os tecidos que apresentam processos inflamatórios crônicos fornecem um microambiente rico em células inflamatórias, em fatores de crescimento para a proliferação celular e em EROs. As EROs, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e outros oxidantes, formam-se fisiologicamente em proporções controladas por mecanismos de defesa celular. Porém, em algumas condições patológicas, como nos processos inflamatórios crônicos, essa produção de EROs pode aumentar substancialmente, resultando em estresse oxidativo (SCHMATZ, 2011).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, em particular as EROs, e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies. Quando há um favorecimento à produção de EROs e um quadro de estresse oxidativo é instalado, a transformação progressiva de células para a sua forma maligna ocorre mais facilmente, proporcionando um aumento na frequência de mutações pelo danos ao DNA e, conseqüentemente, um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias (ARDIES, 2003; COOK et al., 2004; GOTO et al., 2007).

As EROs apresentam potencial para causar danos irreversíveis em biomoléculas importantes, tais como lipídeos de membrana, proteínas e DNA, através de sua capacidade de induzir alterações bioquímicas (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003; WU et al., 2004) (Figura 8).

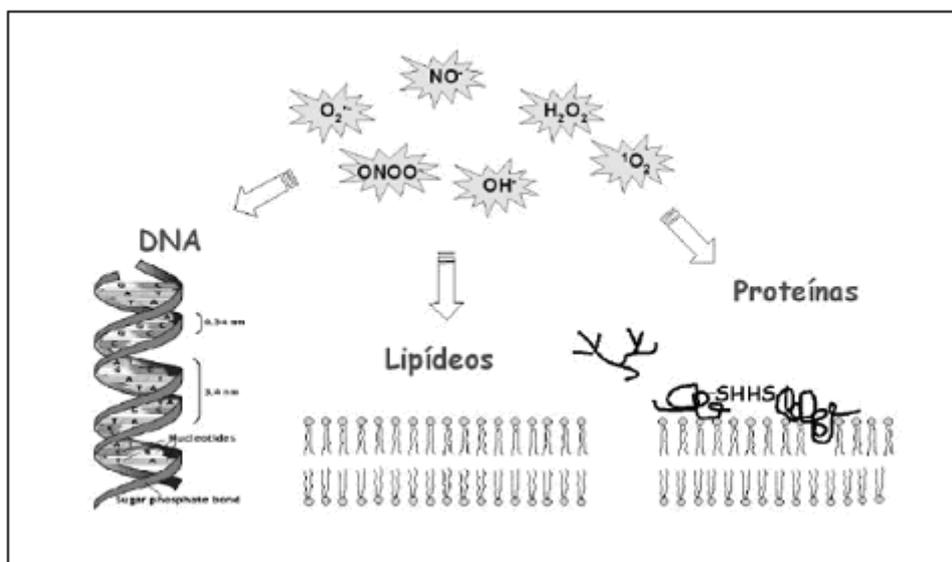


Figura 8 – Dano oxidativo às macromoléculas biológicas.

Fonte: TORRES (2003), com adaptações.

É importante frisar, aqui, que as células do tumor são conhecidas por serem os principais responsáveis pela produção e liberação de EROs na circulação (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004) e, para tanto, vários mecanismos que conduzem ao estresse oxidativo foram propostos em pacientes com câncer, dentre eles encontramos alterações no metabolismo energético (BAKAN et al., 2003), a inflamação crônica não-específica (MANTOVANI et al., 1998) e por fim o uso de drogas antineoplásicas (BAKAN et al., 2003).

Diversos estudos evidenciam o envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento do câncer (TOYOKUMI et al., 1995; MALDONADO et al., 2006;

FARIAS, 2011), sendo que, outros trabalhos, como o desenvolvido por Klaunig e Kamendulis (2004), demonstram que o estresse oxidativo participa diretamente da iniciação, promoção e progressão tumoral (Figura 9).

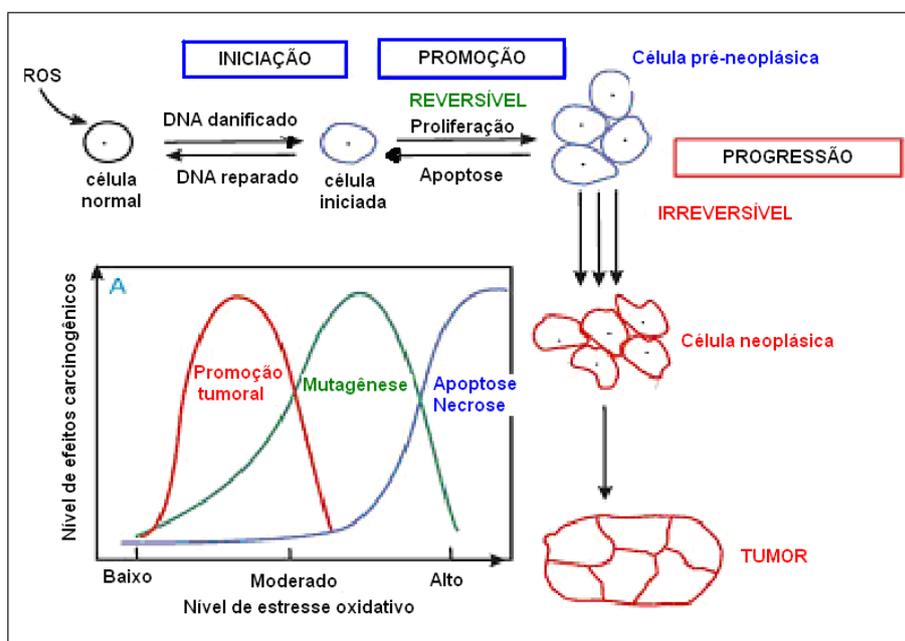


Figura 9 – Nível de efeitos carcinogênicos *versus* nível de radicais livres nos vários estágios do processo de carcinogênese

Fonte : VALKO et al. (2006), com adaptações.

Ainda não está bem estabelecido se o estresse oxidativo verificado em células tumorais resulta de um aumento na produção de oxidantes ou de falhas nos mecanismos de defesa (TOYOKUNI et al., 1995), entretanto é importante lembrar que as células tumorais estão frequentemente em hipóxia (OLIVEIRA; ALVES, 2002), o que pode alterar a regulação de suas defesas antioxidantes.

Os efeitos nocivos das EROs são equilibrados pela ação dos sistemas antioxidantes. 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. Do ponto de vista biológico, pode-se também definir antioxidantes como compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (JORDÃO et al., 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Esta definição engloba compostos de natureza enzimática e não enzimática (SIES, 1993; VALKO et al., 2007).

Entre os antioxidantes enzimáticos, o sistema composto pela atividade de enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) é o mais eficiente (BONNEFOY et al., 2002), cumprindo destacar que a detoxificação das EROs envolve um mecanismo de elevada sincronia, em que as enzimas antioxidantes atuam de maneira cooperativa.

A função da SOD foi descoberta em 1969 por McCord & Fridovich, o que propiciou um grande avanço das pesquisas na área de toxicidade do oxigênio, existindo três classes de superóxido dismutase: Fe-SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD. A CuZn-SOD e a Mn-SOD encontram-se em eucariotos e a Fe-SOD apenas em procariotos. A SOD dependente de cobre e zinco encontra-se no citoplasma celular e nos fluidos extracelulares, onde é secretada pelas células endoteliais; já a Mn-SOD é uma enzima mitocondrial tetramérica, apresentando um átomo de manganês por subunidade (SEIZI, 2003).

A SOD está presente em todos os organismos aeróbicos, cabendo a ela catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , que é menos reativo. O H_2O_2 gerado pela SOD agora poderá ser degradado por outras enzimas, como a CAT (Figura 10) (MCCORD; FRIDOVICH,1969; FARBER,1990).

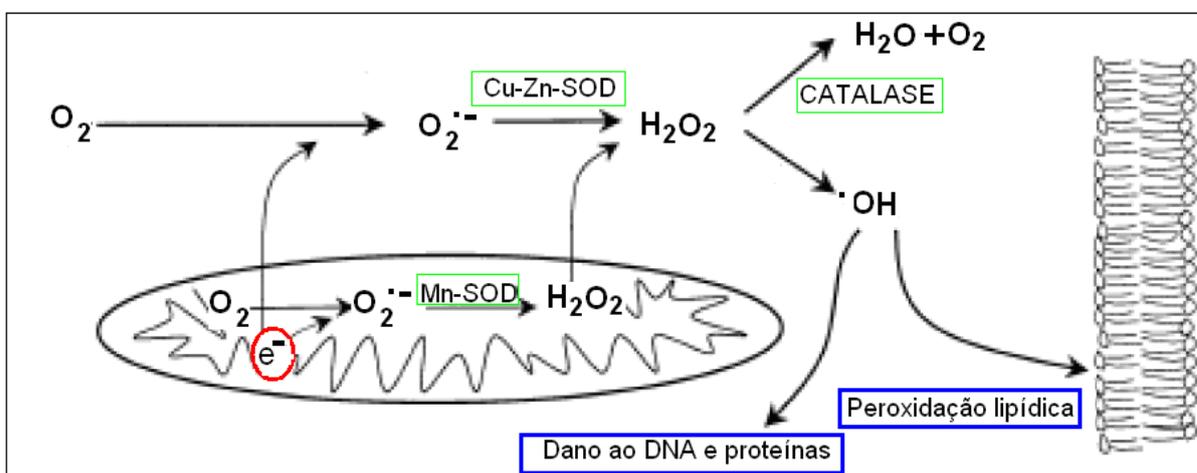


Figura 10 – Mecanismo enzimático antioxidante
Fonte: NORDBERG; ARNÉR (2001), com adaptações.

A CAT é uma enzima tetramérica composta por quatro subunidades idênticas, que contêm um único grupo ferroprotoporfirina por unidade. Essa enzima é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado e sua atividade é dependente de NADPH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), reagindo eficientemente com o H_2O_2 para formar água e oxigênio molecular (MATTES et al., 1999).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, também possuem grande relevância no controle dos processos oxidativos os antioxidantes não enzimáticos. Sabe-se que o organismo tem a capacidade 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). É especialmente importante destacar, entre os antioxidantes não enzimáticos, os compostos contendo grupos sulfidril (SH), chamados tióis, cuja capacidade para evitar a oxidação se deve, geralmente, ao átomo de enxofre que pode facilmente acomodar a perda de elétron (KAROUI et al., 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; MASELLA et al., 2005).

A glutathiona reduzida (GSH) é o tiol não-protéico mais abundante nas células animais (MEISTER; ANDERSON, 1983), sendo formada por cisteína, glicina e resíduos de ácido glutâmico e cuja capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH presente na cisteína. 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 (SHAN et al., 1990; ARTEEL; SIES, 2001).

Assim, tanto as defesas antioxidantes enzimáticas, quanto as não-enzimáticas, são extremamente importantes, uma vez que a supressão direta de radicais livres (pró-oxidantes) proporciona máxima proteção para os sítios biológicos, podendo prevenir, dessa maneira, o desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo, inclusive o câncer de pulmão (MASUTANI, 2000; BRIGELIUS-FLOHE et al., 2002).

Neste contexto, considerando-se o importante potencial imunomodulador dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, o notável papel do sistema colinérgico extraneuronal na função imune e inflamatória e conhecendo-se o envolvimento dos processos oxidativos celulares com o desenvolvimento e a progressão das doenças neoplásicas, torna-se de grande valia verificar a atividade de ectonucleotidases, de colinesterases e biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com câncer de pulmão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Verificar a atividade de ectonucleotidasas, de colinesterases e de indicadores do perfil oxidativo em pacientes com câncer de pulmão.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade da enzima NTPDase em linfócitos de pacientes com câncer de pulmão;
- Analisar a atividade da enzima ADA em soro de pacientes com neoplasia pulmonar;
- Verificar a atividade das enzimas AChE, no sangue total, e da BChE em soro de pacientes com câncer de pulmão;
- Determinar a atividade das enzimas SOD e CAT no sangue total dos pacientes citados acima e;
- Determinar o conteúdo de T-SH e NPSH no soro dos pacientes referidos anteriormente.

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um manuscrito. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O manuscrito está formatado de acordo com as normas para publicação da revista *Clinica Chimica Acta*.

Manuscrito: Activity of ectoenzymes and cholinesterases and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer

3.1 Manuscrito

ACTIVITY OF ECTOENZYMES AND CHOLINESTERASES AND BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH LUNG CANCER

Daniela Zanini^a, Roberta Schmatz^a, Luana Paula Pelinson^a, Victor Camera Pimentel^a, Pauline da Costa^a, Andréia Machado Cardoso^a, Caroline Curry Martins^a, Christina Chitolina Schetinger^a, Jucimara Baldissareli^a, Maria do Carmo Araújo^{a,b}, Liliane Oliveira^b, Juarez Chiesa^b, Vera Maria Morsch^a, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a*}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bSetor de Hematologia/Oncologia, Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author:

Address correspondence and reprint requests to:

Maria Rosa Chitolina Schetinger (mariachitolina@gmail.com)

Tel: + 55-55-3220-9557

Fax: + 55 55 32208978

ABSTRACT

Objectives: To examine the NTPDase activity in lymphocytes, adenosine deaminase (ADA), and butyrylcholinesterase (BChE) activities in serum and acetylcholinesterase (AChE) activity in whole blood, since these enzymes modulate the hydrolysis of molecules involved in immune responses and in inflammation. We also checked the activity of the enzymes involved in oxidative stress conditions as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and verified the levels of total thiols (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) in the serum of patients with lung cancer

Material and Methods: We collected blood samples from patients with lung cancer (n=31) previously treated for lung cancer with chemotherapy and from control patients (n=31). Patients with lung cancer were classified as stage IIIb and IV according to the Union for International Cancer Control (UICC).

Results: Patients showed a significant increase in the hydrolysis of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) in lymphocytes and adenosine in serum ($P \leq 0.05$). The activity of AChE enzyme in whole blood was higher in patients with lung cancer compared with the control group ($P \leq 0.05$). The activity of SOD and CAT as well as the T-SH and NPSH levels were higher in patients compared with the control group ($P \leq 0.05$).

Conclusions: These findings demonstrated that the enzymes activity involved in the control of inflammatory and immune processes (such as NTPDase, ADA, and AChE) as well as the activity of antioxidant enzymes and the levels of non-enzymatic antioxidants are altered in patients with lung cancer.

Keywords: Lung neoplasm; NTPDase; Adenosine deaminase; Acetylcholinesterase; Enzymatic antioxidants; Non-enzymatic antioxidants; Inflammation.

1 INTRODUCTION

Recent studies have showed that lung cancer has been the most commonly diagnosed cancer as well as the main cause of cancer death in men worldwide. Among women, it has been the fourth most commonly diagnosed cancer and the second main cause of cancer death [1].

This "epidemic" of lung cancer in the mundial population is closely related with tobacco consumption [2]. The smoking is characterized as one of the main factors that lead to cancer development since 1950 [3] and increasingly epidemiological studies have been developed in response to this convincing correlation. Other risk factors, including occupational carcinogens (i.e., crystalline silica dust, asbestos), residential radon, passive smoking, ambient air pollution, as well as other unknown risk factors may contribute to the lung cancer risk [2].

Chronic lung diseases, such as neoplastic disease are characterized by persistent inflammation and tissue remodeling that contributes to a progressive decline in lung function [4]. A common feature of these disorders is the recruitment and activation of effector cells such as lymphocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, fibroblasts, and epithelial cells, which release mediators that promote additional inflammation [5].

Lymphocyte cells are intimately involved in inflammatory processes and one of the ways in which lymphocyte function is regulated is through a family of enzymes called ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) [6]. The NTPDase (EC 3.6.1.5, CD39) is an enzyme that hydrolyzes extracellular nucleotide tri-and/or diphosphates (preferably ATP and ADP) [7]. This sequential desphosphorylation of nucleotide triphosphates generates ADP, AMP and adenosine that are involved in the regulation of immune defenses [6, 8]. ATP acts as a pro-

inflammatory agent that potentiates the release of pro-inflammatory cytokines from activated lymphocytes and can act as a signaling compound in cytolytic mechanisms [9].

Adenosine is a metabolite of adenine nucleotides and presents immunosuppressive, anti-inflammatory and tumor promoting functions. Immunosuppressive and anti-inflammatory functions include inhibition of pro-inflammatory cytokine release, inhibition of adhesion of immune cells and inhibition of proliferation of T cells through the activation of A2A receptors. Tumor promoting functions of adenosine are a result of the fact that it facilitates the growth of certain tumors by stimulating angiogenesis and by reducing hypoxia through vasodilatation [10, 11].

It is also known that adenosine is inactivated in the extracellular medium by the action of adenosine deaminase (ADA, E.C 3.5.4.4). This enzyme catalyses the irreversible deamination of adenosine and deoxyadenosine into inosine and deoxyinosine, respectively [11].

Apart from the involvement of purinergic signaling in pro-inflammatory and anti-inflammatory events, the cholinergic system has been extensively studied in these processes. Acetylcholine (ACh) is the main molecule involved in cholinergic functions. It is a neurotransmitter, however, recent experiments in humans have documented a wider expression of the cholinergic system in several nonneuronal tissues, i.e., in immune and blood cells [12].

These nonneuronal tissues possess a complete cholinergic system consisting of ACh, muscarinic and nicotinic receptors, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase (AChE). In the peripheral blood, the ACh circulating may regulate various physiological functions, including immune modulation [13]. Thus,

when ACh is found in high concentrations in blood it acts as an anti-inflammatory agent [12]. The action of ACh is prevented by local inactivating enzymes, predominantly the specific AChE and the nonspecific butyrylcholinesterase (BChE) [13].

Another important aspect that should be considered in tissues that present persistent inflammation is the presence of reactive oxygen species (ROS). It is well known that tissues that have chronic inflammatory process provide a microenvironment rich in inflammatory cells, growth factors for cell proliferation, and ROS. All these make the progressive transformation of cells into the malignant form easier, increasing the frequency of mutations by the damage to DNA and, consequently, the risk of developing lung cancer [14, 15].

ROS, present in inflamed tissue, can be the cause of the development of the inflammatory process thus they have great importance in tumorogenesis [16]. It is worth noting here that the tumor cells are known to be mainly responsible for the production and release of ROS in the circulation [17]. Moreover, ROS can cause irreversible damage to important biomolecules such as membrane lipids, proteins, and DNA through their ability to induce biochemical alterations [18, 19].

The effects of ROS are balanced by the action of enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. Among the enzymatic antioxidants, the system composed of the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) is the most efficient, whereas among the non-enzymatic antioxidants, compounds containing sulfhydryl groups (SH), called thiols, are especially important [20].

In view of this, we aimed to investigate the activity of the enzymes responsible for the hydrolysis of adenine nucleotides and nucleosides and the activity of the

enzymes responsible for the hydrolysis of ACh in patients with lung cancer, since these enzymes modulate the hydrolysis of molecules involved in immune responses and in inflammation. We also checked the activity of the enzymes involved in oxidative stress conditions, such as SOD and CAT, and verified the levels of T-SH and NPSH of patients with lung cancer since oxidative events are closely related to the development of inflammatory processes and neoplasms.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Nucleotides and Trizma base were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ficoll-Histopaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Antibodies for the flow cytometry analysis, R-Phycoerythrin (R-PE)–conjugated mouse anti-human monoclonal antibody against CD39 and fluorescein isothiocyanate (FITC)–conjugated mouse anti-human monoclonal antibody against CD45 were purchased from BD PharMingen Technical Data Sheet (San Jose, CA). Acetylthiocholine iodide (ASCh), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Ellman's reagent) and Triton X-100 were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany), ethopropazine hydrochloride from Aldrich (Steinheim, Germany). All the other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2 Patient selection

Patients included in this study were diagnosed with lung cancer of non-small cells at the University Hospital of Santa Maria. Patients in this study had disease in stages IIIb and IV disease, according to Union for International Cancer Control

(UICC), in other words, the neoplasia compromised lymphonodes and had metastases. Patients were being treated with antineoplastic cisplatin and gencitabine. This group consisted of 31 individuals with over 50 years of age and who had no other comorbidities such as hypertension or diabetes. The blood sample was collected in EDTA, citrate and without anticoagulant vacutainer tubes, when the patients had scheduled appointments in the field of Hematology/Oncology, University Hospital of Santa Maria. The control group was composed of 31 healthy individuals with the same age of the patient group. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria under the number 0061.0.243.000-10 and all the patients signed a written consent.

2.3 Isolation of mononuclear cells from human blood

Mononuclear leukocytes were isolated from human blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [21]. Despite the methodology described above to be used for separating mononuclear cells, the work done by Jaques et al. [22] demonstrated that there is a high incidence of lymphocytes in separate samples and the amount of monocytes is almost insignificant. For this reason we will treat the samples as containing only lymphocytes. Lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells, excluding 0.1% trypan blue and measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity [23]. These samples were used for the assay of enzymatic NTPDase.

2.4 NTPDase enzyme assays

After lymphocyte isolation, NTPDase activity was determined as described by Leal et al. [7] where the reaction medium contained 0.5 mmol/L CaCl_2 , 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 60 mmol/L glucose and 50mmol/L Tris-HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200 μL . Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2-4 μg of protein) and pre-incubated for 10 min at 37 °C and incubation proceeded for 70 min.

The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mmol/L and stopped with 200 μL of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [24] using malachite green as colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.5 Flow cytometry analysis for CD39

Peripheral blood cells were incubated using R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody against CD39 and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody against CD45 (20 μL /10⁶ cells) for 25 min, erythrocytes were lysed with reagent FACS (fluorescent activated cell sorter) lysis and incubated again for 15 min in the dark. Cells were washed twice in PBS buffer (pH 7.4) containing 0.02% (W/V) sodium azide and 0.2% (W/V) BSA. The cells were then resuspended in PBS buffer (pH 7.4) and immediately analyzed by FACSCalibur flow cytometer using Cell quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA) without fixation.

2.6 Blood serum obtain

The blood was collected in vacutainer tubes without an anticoagulant system, centrifuged at 5000 rpm for 10 min, the clot was discarded and the serum was used to determine the ADA and BChE activity as well as TSH and NPSH levels.

2.7 Adenosine deaminase (ADA) activity determination

ADA, in serum, was determined according to Guisti and Galanti [25]. Briefly, 50 μ L of serum reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. Results were expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

2.8 Serum butyrylcholinesterase (BChE) activity

For BChE activity, the blood was collected in vacutainer tubes without any anticoagulant to obtain the serum. The BChE enzymatic assay was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961) [26] as previously described by Rocha et al. (1993) [27]. The reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 and 1.0 mM DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25 °C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM butyrylthiocholine iodide (BuSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in μ mol BuSCh/h/mg of protein.

2.9 Sample preparation for acetylcholinesterase (AChE) activity

For AChE activity in whole blood with EDTA, the samples were hemolized with phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 containing Triton X-100 (0.03%) and stored at -20 °C for 1 week.

2.10 Whole blood AChE activity

Whole blood AChE activity was determined by the method of Elmann et al. [26] modified by Worek et al. [28]. To achieve temperature equilibration and complete reaction of sample matrix sulfhydryl groups with DTNB, the mixture was incubated for 10 min prior to addition of substrate. Enzyme activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and DTNB degradation. The BChE (EC 3.1.1.8) was inhibited by ethopropazine. AChE activity was measured at 436 nm and 37 °C using polystyrol cuvetts. The activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and protein content and the results are expressed as $\mu\text{mol/h/mg}$ of protein.

2.11 Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities

Superoxide dismutase (SOD) activity in whole blood was performed according to the method of Misra and Fridovich [29]. In this method, SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50% the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a

reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM). The SOD activity was expressed in U SOD/mg protein.

The determination of the CAT activity was carried out in accordance with a modified method of Nelson and Kiesow [30]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to CAT dependent decomposition of hydrogen peroxide. An aliquot (0.02 mL) of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was initiated by the addition of 0.07 mL in an aqueous solution of hydrogen peroxide 0.3 mol/L. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. The CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient ($0.0436 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) and the results were expressed as nmol/mg protein.

2.12 Determination of total thiols and non protein thiols

Total thiol groups (T-SH) were assayed in serum by the method of Boyne and Ellman [31] with some modifications, which consists of the reduction of 5,5'-dithio (bis-nitrobenzoic) acid (DTNB) in pH 7.0, measured at 412 nm. The results were expressed in $\mu\text{mol T-SH/mL}$ serum.

Non-protein thiols were assayed in serum by the method of Ellman [32] with some modifications. Aliquots (0.1 mL) of serum were added to a phosphate buffer 0.3 mol/L (0.85 mL), pH 7.4 and the reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 mL). Results were expressed as $\mu\text{mol NPSH/mL}$ of serum.

2.13 Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method according to Bradford [33] using bovine serum albumin as standard.

2.14 In vitro effects of drugs used in the treatment of patients with lung cancer on NTPDase, ADA, BChE, AChE, SOD and CAT activities

The *in vitro* effects of cisplatin and gencitabine on NTPDase, ADA, BChE, AChE, SOD and CAT activities were evaluated. For NTPDase activity assay lymphocytes from healthy subjects were isolated and incubated with different concentrations of these drugs in the medium reaction as previously described. All concentrations of cisplatin (0.005, 0.01 and 0.02 µg/mL) and gencitabine (10, 20 and 40 µg/mL) used *in vitro* were based on the mean plasma values of the medications. For ADA and BChE activity assay, blood serum was separated, for AChE, SOD and CAT activity assay whole blood was used. Biological samples used in the *in vitro* tests were collected from healthy subjects. Cisplatin and gencitabine drugs were tested in the same concentrations described above following the protocols previously described. Drugs were diluted in 100% water.

2.13 Statistical analysis

For the statistical values, we used t-student test. The results were considered significant at $P \leq 0.05$ and are expressed as mean \pm standard deviation. Some data were analyzed by Pearson's correlation and by one-way ANOVA followed by the Duncan's. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses.

3 RESULTS

3.1 Patient characteristics

The classification of patients with lung cancer enrolled in this study regarding gender, age, smokers, antineoplastic drugs, and classification of the disease stage

are shown in Table 1. Most of the patients involved in this study were male, over sixty years old; 100% of the men and 82% of the women involved in this study were smokers. The patients were diagnosed with lung cancer in stage IIIb and IV of the disease according to the Union for International Cancer Control (UICC).

3.2 NTPDase, ADA, BChE, AChE, SOD, and CAT activities in the presence of cisplatin and gencitabine

In vitro concentrations ranging from zero to 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for cisplatin and from zero to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for gencitabine were not capable of altering NTPDase activity in lymphocytes, ADA, and BChE activities in serum, AChE, SOD, and CAT activities in whole blood of healthy subjects (Table 2).

3.3 NTPDase activity

The results described here are from t-student test. Fig 1A shows NTPDase activity using ATP as substrate. As can be observed, the ATP hydrolysis presented a significant increase in the patient group (65.96 ± 7.75) when compared with the control group (39.39 ± 4.64) ($P < 0.05$). Fig 1B shows the NTPDase activity using ADP as substrate. As evidenced, the ADP hydrolysis was significantly increased in the patient group (67.50 ± 6.82) when compared with the control group (44.17 ± 3.70) ($P \leq 0.05$).

3.4 CD39 expression

The percentage of CD39 positive cells in lymphocytes from lung cancer patients group (14.09 ± 1.44) showed no significant differences when compared with the control group (12.99 ± 2.05) (Fig 2) ($P \leq 0.05$).

3.5 Adenosine deaminase activity

ADA activity was significantly increased in lung cancer patients (31.71 ± 2.17) compared with the control group (23.67 ± 0.90) (Fig 3) ($P \leq 0.05$).

3.6 Butyrylcholinesterase activity

BChE activity is shown in Fig 4A. No significant differences in the activity of this enzyme were observed between lung cancer patients (7.49 ± 0.40) and the control group (7.85 ± 0.30) ($P \leq 0.05$).

3.7 Acetylcholinesterase activity

AChE activity was significantly increased in lung cancer patients (231.0 ± 12.81) when compared with the control group (191.4 ± 10.89) (Fig 4B) ($P \leq 0.05$).

3.8 Superoxide dismutase and catalase activity

SOD and CAT activities are shown in Fig 5A and Fig 5B, respectively. We observed a significant increase in the activity of these enzymes in lung cancer patients (SOD: 22.48 ± 1.47 / CAT: 28.41 ± 2.37) when compared with the control group (SOD: 16.96 ± 1.63 / CAT: 13.64 ± 0.82) ($P \leq 0.05$).

3.9 Total thiol and non-protein thiol levels

T-SH and NPSH levels are shown in Fig 6A and Fig 6B, respectively. These levels were significantly increased in lung cancer patients (T-SH: 0.82 ± 0.05 / NPSH:

0.13±0.01) when compared with the control group (T-SH: 0.68±0.04 / NPSH: 0.11±0.01) ($P \leq 0.05$).

3.10 Correlation between enzyme activity and characteristics of smoking among patients

As can be observed in Table 3, there was a positive correlation between the activity of ADA, SOD, and CAT in relation to the age of the smoking patients. There was also a positive correlation between the activity of NTPDase for the ATP hydrolysis in relation to the years of smoking, as well as a positive correlation between the activity of NTPDase for ATP and ADP hydrolysis and between the ADA activity in relation to the quantity of cigarettes smoked.

4 DISCUSSION

The functional relationship between inflammation and cancer has been reported for several decades and remains an important focus of study. In 1863, Virchow hypothesized that the origin of cancer was at sites of chronic inflammation; in part, based on his hypothesis that some classes of irritants along with the tissue injury and ensuing inflammation cause enhance cell proliferation [34]. Although today it is very clear that the proliferation of cells alone does not cause cancer, it is well established that cell proliferation in an environment rich in inflammatory cells is associated with an increase of risk of developing a malignancy disease [35].

Another important factor to be highlighted is the involvement of cigarette smoking on carcinogenic processes. Besides the fact that cigarette smoking contributes to the development and progression of tumors through their pro-

inflammatory property by stimulating the expression of the enzyme cyclooxygenase 2 (COX-2) in many cell types [36] the presence of carcinogenic components, such as polyaromatic hydrocarbons and nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone promotes the generation of ROS. These, then, activate molecular events that induce a chronic inflammation and, consequently, lung cancer [16].

In addition, several studies have demonstrated that ATP, ADP, AMP, and their nucleoside derivative, adenosine, are important signaling molecules that mediate diverse biological and pathological processes [37] in special cases involving immune and inflammatory cells. Apart from the involvement of the purinergic system in inflammatory processes, ACh, the main molecule involved in events mediated by the cholinergic signaling, is closely related to the regulation of inflammatory responses.

Initially, we performed an investigation into the general characteristics, such as gender, age, number of smoking, chemotherapy achieved, and staging of disease of the patients with lung cancer selected for this study. Our results showed that the incidence of lung cancer is higher in men than in women, which is in accordance with other studies [1, 38]. Another important aspect observed in this survey is that the vast majority of patients with lung cancer smoked cigarettes for at least four decades of their lives. These results corroborate with those found by Farrow and Evers (2002) [39] that pointed out that the cigarette smoking is an inflammatory condition related to the development of bronchial lung cancer.

As quoted previously, the stimulation of COX-2 by smoking is one of the pathways for the development of inflammation in smokers. This enzyme is responsible for converting arachidonic acid into prostaglandins (PGs) such as PGE₂ [40]. The stimulation of expression of COX-2 and consequent production of PGE₂

may promote tumor development in two ways, either by pro-inflammatory action [41], or their immunosuppressive effects that facilitates the uncontrolled proliferation of malignant cells [42]. Furthermore, a recent study has shown that the deficiency of COX-2 or PGE2 receptor EP2 significantly decreased the growth, angiogenesis, and pulmonary metastasis of mammary tumors produced in mice [43].

Over the last decade, it has been established that purinergic signaling contributes to the fine-tuning of inflammatory and immune responses [9]. The evidence indicates that extracellular ATP, by the action of a group of P2 nucleotide receptors present in many cell types, including lymphocytes, is involved in pro-inflammatory functions such as stimulation and proliferation of lymphocytes and cytokine release [9, 44], thus, the hydrolytic NTPDase activity in lymphocytes from human peripheral blood can control the levels of ATP extracellular.

The results of the present study demonstrate that NTPDase activity was increased for the hydrolysis of ATP and ADP in lymphocytes from lung cancer patients. With an increased NTPDase activity for the hydrolysis of ATP observed in this study, the concentrations of extracellular ATP are decreased and thus the pro-inflammatory effect of ATP can be minimized. Therefore, an increase of the nucleotide hydrolysis could be related to a compensatory response to the inflammatory state that is developed during the neoplastic diseases.

Despite the significant increase of NTPDase activity in lymphocytes from patients with lung cancer, no significant changes were observed in the expression of CD39 in the lymphocytes of these patients. Thereby, we can suggest that the increase in the hydrolysis of ATP and ADP nucleotides are linked to an increase in the enzymatic activity and not to the overexpression of NTPDase.

Another important molecule of the purinergic signaling involved in inflammatory processes is adenosine. Opposing the actions of ATP, adenosine, by its action mainly in adenosine A2A receptor, exhibits a potent anti-inflammatory and immunosuppressive action by inhibiting the proliferation of T cells and secretion of cytokines [10, 45]. The levels of extracellular adenosine are modulated by the hydrolytic action of ADA, an enzyme present on the surface of various cell types and also in the serum in its soluble form.

In this study, the ADA activity in serum was increased in patients with lung cancer compared with the control group. It is important to point out that an increase in the ADA activity can cause a reduction in the concentration of adenosine in the extracellular medium, reducing the beneficial anti-inflammatory effects of adenosine. On the other hand, adenosine also presents tumor promoting functions to facilitate the growth of some tumors by stimulating angiogenesis [11] thus a decreased availability of adenosine in the tissue may benefit patients with lung cancer.

However, some studies suggest that the rise in serum ADA levels in patients with malignancy is directly proportional to the primary tumor mass [46]. Aghaei et al. [47] have reported an increased total ADA activity in breast cancer and this increase was significantly higher according to the grade and the size of the tumor. Therefore, the increase of the ADA activity in serum of patients with lung cancer verified in the present study may be related to the progression of tumor development and may even bring more complications for patients who have already compromised health.

Besides the involvement of adenine nucleotides and nucleosides in immune and inflammatory responses through the action at the purinoreceptors, the

cholinergic extraneural system presents an important contribution in the events related to the immune process by the action of ACh.

In line with this, we observed an increase in the AChE activity in whole blood in lung cancer patients. This result indicates a possible reduction in the ACh levels in blood and a consequent decrease in the anti-inflammatory activity promoted by this molecule. A similar result was observed in a study conducted in our research group with individuals newly diagnosed with acute lymphoblastic leukemia [48].

This relationship between ACh and control of immune and inflammatory process can be seen, for example, in its action on macrophages. When macrophages are exposed to ACh they are effectively deactivated because ACh can interact specifically with macrophage $\alpha 7$ subunits of nicotinic ACh receptors, leading to cellular deactivation and inhibition of cytokine release [49]. The nonneuronal ACh that is present in the bloodstream is very efficiently captured by erythrocytes [12] thus changes in the erythrocyte activity of the AChE exert changes in circulating levels of ACh.

BChE is another important enzyme responsible for the hydrolysis of ACh and other cholines modulating the levels of these molecules in the extracellular medium. In this study, however, BChE activity was not altered in the lung cancer patient when compared with the control group.

As mentioned above, there is a strong relationship between ROS production, the development of inflammatory processes, and tumor formation. The production of ROS is a normal process during aerobic metabolism with participation in various cellular functions, however, when there is an excessive increase in their production, they are the key players in lung inflammation and lung cancer [16]. For all these reasons, the effective action of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system

of the individuals with lung cancer is essential for controlling the damage caused by the overproduction of ROS, and SOD and CAT are antioxidant enzymes that form the first line of defense against ROS *in vivo* [50].

In line with this, in our study we observed an increase in the activities of the antioxidant enzymes SOD and CAT, in whole blood, in lung cancer patients when compared with the control group. These results suggest that the activity of the enzymes SOD and CAT may be increased by the fact that patients with lung cancer showed an overproduction of ROS because, as noted earlier, tumor cells are primarily responsible for the production of ROS [17]. This increase in the activity of antioxidant enzymes may also be related to the fact that the vast majority of patients have smoked on average for 40 years, and the exposure to toxic components of tobacco leads to an increased production of ROS [16].

In our study we also verified an increase in serum T-SH and NPSH levels in lung cancer patients. The action of non-enzymatic antioxidants, such as total thiols and non-protein thiol groups, are extremely important because they contribute in the protection of normal cell structures and functions, since –SH groups are involved in maintaining the redox homeostasis, quenching free radicals, and participating in detoxification reactions [51].

In this study, in order to exclude a direct effect of drugs used by patients with lung cancer, we also tested NTPDase in lymphocytes, ADA and BChE in serum, AChE, SOD, and CAT in whole blood *in vitro* activities in biological samples from control subjects in the presence of drugs, such as cisplatin and gencitabine. The results obtained demonstrated that these drugs, in the concentrations tested, did not alter NTPDase, ADA, BChE, AChE, SOD, and CAT activities. Consequently, we believe that the enzyme activation observed in the present study was not affected by

the medications used by the patients. In this context, these findings support the argument that it is the pathological condition that generates the alterations of enzyme activities.

Since most patients with lung cancer in this study were smokers and had knowledge about the strong relationship between smoking, development of inflammatory processes, and ROS production, we correlated age, years of smoking, and the quantity of cigarettes smoked by the patients with the activity of enzymes analyzed in this research.

We observed a positive correlation between the activity of ADA, SOD, and CAT in relation to the age of the smoking patients. This result suggests that patients with older age may have a more severe inflammatory and immunosuppressive process, since the levels of adenosine are more impaired and ROS production may be higher in these patients. This leads us to believe that older patients with lung cancer may have physiological conditions more inclined to tumor progression [36].

There was also a positive correlation between the activity of NTPDase for the ATP hydrolysis in relation to the years of smoking, as well as a positive correlation between the activity of NTPDase for ATP and ADP hydrolysis and between ADA activity in relation to quantity of cigarettes smoked. These findings suggest that smoking alters the activity of the enzymes responsible for the hydrolysis of adenine nucleotides and nucleosides. A possible way for this change may be the presence of numerous toxic components of tobacco. These compounds, besides having great carcinogenic activity, promote an increased production of ROS that are damaging action in various biomolecules, such as lipids and proteins and thus may directly affect the enzyme activity [50].

Knowing that the extracellular levels of ATP, adenosine, and ACh can be dynamically controlled by the enzymes of purinergic and cholinergic system and that these molecules are closely related to inflammation and immune responses, these results may suggest that NTPDase, ADA, and AChE are enzymes involved in the control of inflammatory and immune processes, which are strongly linked with the development of tumors, as well as with the progression of neoplastic diseases. Moreover, it is known that tumor cells are primarily responsible for the production of ROS, and SOD, CAT, and non-enzymatic antioxidant systems are efficient mechanisms for the control of oxidative stress; the analysis of these parameters is of great importance in patients with lung cancer.

Thus, this study is of great importance to elucidate some of the mechanisms involved in the development of inflammatory and immune responses associated with lung cancer, such as to check the oxidative status of patients with lung cancer.

5 CONCLUSIONS

For the first time, it is demonstrated here that lung cancer exerts a remarkable alteration in the enzyme activities that hydrolyze ATP, adenosine, and ACh as well as in the enzymes that control the oxidative process. These findings suggest a significant involvement of the enzymes NTPDase, ADA, and AChE in the control of the inflammatory and immune processes, as well as the action of SOD and CAT in the control of oxidative processes, both involved extensively in the development and progression of tumors.

Acknowledgments

The authors wish to thank all the lung cancer patients and the professionals at the Hematology/Oncology Laboratory (HUSM) for their support.

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net), INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

Disclosure Statement

This work is original and is not under consideration by another journal. All the patients signed the written consent and the work was approved by the Human Ethical Committee from the Federal University of Santa Maria Hospital. Finally, this manuscript has been approved by all authors and has no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global Cancer Statistics, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 69-90.
- [2] International Agency of Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: tobacco smoke and involuntary smoking. France: IARC Press; 2004.
- [3] A.J. Sasco, M.B. Secretan, K. Straif, Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence, *Lung Cancer.* 45 Suppl. 2 (2004) S3-S9.
- [4] P.J. Sime, K.M. O'Reilly, Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment, *Clin. Immunol.* 99 (2001) 308-319.
- [5] V.J. Thannickal, G.B. Toews, E.S. White, J.P. Lynch, F.J. Martinez, Mechanisms of pulmonary fibrosis, *Annu. Rev. Med.* 55 (2004) 395-417.
- [6] J. Barankiewicz, H.M. Dosch, A. Cohen, Extracellular nucleotide catabolism in human B and T lymphocytes: The source of adenosine production, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 7094-7098.
- [7] D.B.R. Leal, C.A. Streher, T.N. Neu, F.P. Bittencourt, C.A.M. Leal, J.E.P. Silva, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1721 (2005) 9-15.
- [8] H. Zimmermann, ATP and acetylcholine, equal brethren, *Neurochem. Int.* 52 (2008) 634-648.

- [9] A. Filippini, R.E. Taffs, T. Agui, M.V. Sitkovsky, Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes, protection from the cytolytic effects of extracellular ATP, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 334-340.
- [10] K. Gessi, S. Varani, S. Merighi, Adenosine and lymphocyte regulation, *Purinergic Signal.* 3 (2007) 109-116.
- [11] J. Spychala, Tumor-promoting functions of adenosine, *Pharmacol. Ther.* 87 (2000) 161-173.
- [12] J.P.L. Almeida, C. Saldanha, Nonneuronal cholinergic system in human erythrocytes: Biological role and clinical relevance, *J. Membrane Biol.* 234 (2010) 227-234.
- [13] S.K. Tayebati, D. El-Assouad, A. Ricci, F. Amenta, Immunological and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes, *J. Neuroimmunol.* 132 (2002) 147-155.
- [14] C.M. Ardies, Inflammation as cause for scar cancers of the lung, *Integr. Cancer Ther.* 2 (2003) 238-246.
- [15] J.A. Cook, D. Gius, D.A. Wink, M.C. Krishna, A. Russo, J.B. Mitchell, Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment, *Semin. Radiat. Oncol.* 14 (2004) 259-266.
- [16] N. Azad, Y. Rojanasakul, V. Vallyathan, Inflammation and Lung Cancer: Roles of Reactive Oxygen/Nitrogen Species, *J. Toxicol. Environ. Health, Part B*, 11:1 (2008) 1-15.

- [17] J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis, The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 239-267.
- [18] Y. Taniyama, K.K. Griendling, Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42 (2003) 1075-1081.
- [19] L.L. Wu, C.C. Chiou, P.Y. Chang, J.T. Wu, Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics, *Clin. Chim. Acta.* 339 (2004) 1-9.
- [20] H. Karoui, N. Hogg, C. Fréjaville, P. Tordo, B. Kalyanaraman, Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite-ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6000-6009.
- [21] A. Böyum, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl.* 97 (1968) 77-89.
- [22] J.A.S. Jaques, J.F.P. Rezer, J.B. Ruchel, J. Gutierrez, A.V. Bairros, I.L.G. Farias, S.C.A. Luz, C.M. Bertoncheli, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsh, D.B.R. Leal, A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity, *Anal. Biochem.* 410 (2009) 34-39.
- [23] H.U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Deerfield Beach, 1983.

- [24] K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for the Ca²⁺-ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375-380.
- [25] G. Guisti, B. Galanti, Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
- [26] G.L. Ellman, D.K. Courtney, V. Andres, R.M. Flatherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88-95.
- [27] J.B.T. Rocha, T. Emanuelli, M.E. Pereira, Effects of early undernutrition on 15 kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats, *Acta Neurobiol. Exp.* 53 (1993) 431-437.
- [28] F. Worek, U. Mast, D. Kiderlen, D. Diepold, P. Eyer, Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood, *Clin. Chim. Acta* 288 (1999) 73-90.
- [29] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170-3175.
- [30] D.P. Nelson, L.A. Kiesow, Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25-C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV), *Anal. Biochem.* 49 (1972) 474-478.
- [31] A.F. Boyne, G.L. Ellman, A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components, *Anal. Biochem.* 46 (1972) 639-653.
- [32] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70-77.

- [33] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 218-254.
- [34] F. Balkwill, A. Mantovani, Inflammation and cancer: back to Virchow?, *Lancet* 357 (2001) 539-545.
- [35] L.M. Coussens, Z. Werb, Inflammation and cancer, *Nature* 420 (2002) 860-867.
- [36] R.Y. Huang, G.G. Chen, Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer, *Biochim. Biophys. Acta.* 1815 (2011) 158-169.
- [37] V. Ralevic, G. Burnstock, Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases, *Drug News Perspect.* 16 (2003) 133-140.
- [38] J.S. De Cos Escuín, El cáncer de pulmón en España. Epidemiología, supervivencia y tratamiento actuales, *Arch. Bronconeumol.* 45 (2009) 341-348.
- [39] B. Farrow, B.M. Evers, Inflammation and the development of pancreatic cancer, *Surg. Oncol.* 10 (2002) 153-169.
- [40] S. Hastürk, B. Kemp, S.K. Kalapurakal, J.M. Kurie, W.K. Hong, J.S. Lee, Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma, *Cancer* 94 (2002) 1023-1031.
- [41] C.A. Martey, S.J. Pollock, C.K. Turner, K.M. O'Reilly, C.J. Baglolle, R.P. Phipps, P.J. Sime, Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287 (2004) L981-L991.

- [42] H. Harizi, J.B. Corcuff, N. Gualde, Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology, *Trends Mol. Med.* 14 (2008) 461-469.
- [43] A. Greenhough, H.J. Smartt, A.E. Moore, H.R. Roberts, A.C. Williams, C. Paraskeva, A. Kaidi, The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment, *Carcinogenesis* 30 (2009) 377-386.
- [44] H. Langston, Y. Ke, A. Gewirtz, K. Dombrowski, J. Kapp, Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP, *J. Immunol.* 170 (2003) 2962-2970.
- [45] S. Deaglio, K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, S.C. Robson, Adenosine generation catalysed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 1257-1265.
- [46] H. Lal, S.K. Munjial, U. Wig, A.S. Saini, Serum enzymes in head and neck cancer III, *J. Laryngol. Otol.* 101 (1987) 1062-1065.
- [47] 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.
- [48] V. Battisti, M.R.C. Schetinger, L.D.K. Maders, K.F. Santos, M.D. Bagatini, M.C. Correa, R.M. Spanevello, M.C. Araújo, V.M. Morsch, Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients, *Clin. Chim. Acta.* 402 (2009) 114-118.

- [49] C.J. Czura, K.J. Tracey, Autonomic neural regulation of immunity, *J. Intern. Med.* 257 (2005) 156-166.
- [50] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. 1999, University Press, Oxford.
- [51] K.S. De Bona, L.P. Bellé, P.E.R. Bittencourt, G. Bonfanti, L.O. Cargnelluti, V.C. Pimentel, A.R. Ruviaro, M.R.C. Schetinger, T. Emanuelli, M.B. Moretto, Erythrocytic enzymes and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: Benefic effect of *Syzygium cumini* leaf extract *in vitro*, *Diab. Res. Clin. Pract.* (2011) doi:10.1016/j.diabres.2011.06.008.

Table 1

Patient characteristics

	Men	Women
Number of patients	20 (65%)	11 (35%)
Mean age	68±14 years	60±9 years
Smokers	20 (100%)	9 (82%)
Medication:		
cisplatin and gencitabine	13 patients	3 patients
gencitabine	7 patients	8 patients
Staging:		
IIIb	4 patients	3 patients
IV	16 patients	8 patients

Table 2

Effect of drugs on NTPDase in lymphocytes, ADA and BChE in serum, AChE, SOD and CAT in whole blood activities from healthy subjects

Drug ($\mu\text{g/mL}$)	NTPDase ATP	NTPDase ADP	ADA	BChE	AChE	SOD	CAT
Cisplatin							
0	47.4 \pm 0.7	40.5 \pm 2.1	22.4 \pm 1.2	9.2 \pm 0.7	236.8 \pm 15.4	21.9 \pm 0.96	11.4 \pm 0.84
0.005	47.6 \pm 1.6	42.3 \pm 1.7	20.8 \pm 2.0	9.6 \pm 0.8	229.9 \pm 14.9	21.9 \pm 0.24	11.2 \pm 1.23
0.01	50.6 \pm 1.4	42.4 \pm 2.3	21.6 \pm 2.0	9.7 \pm 0.8	189.5 \pm 13.6	19.7 \pm 0.30	11.0 \pm 1.36
0.02	47.4 \pm 1.1	39.7 \pm 3.6	20.8 \pm 2.4	9.1 \pm 0.8	200.9 \pm 13.0	20.1 \pm 2.07	12.3 \pm 2.19
Gencitabine							
0	47.4 \pm 0.7	40.5 \pm 2.1	22.4 \pm 1.2	9.2 \pm 0.7	236.8 \pm 15.4	21.9 \pm 0.96	11.4 \pm 0.84
10	47.0 \pm 0.9	41.9 \pm 2.2	21.6 \pm 2.7	7.6 \pm 0.5	259.5 \pm 10.8	18.1 \pm 2.00	12.0 \pm 1.34
20	47.5 \pm 0.6	41.5 \pm 3.7	20.7 \pm 2.4	7.2 \pm 0.6	255.6 \pm 14.5	19.5 \pm 1.67	11.8 \pm 1.90
40	48.0 \pm 2.1	42.9 \pm 3.3	22.3 \pm 2.2	8.7 \pm 0.7	206.9 \pm 9.4	23.7 \pm 1.04	13.6 \pm 2.20

Values represent mean \pm standard deviation from four control individuals.

Table 3

Enzyme activity and characteristics of smoking patients with lung cancer correlation

	Age	YS*	QS**
NTPDase – ATP	<i>ns</i>	<i>r=0.1640</i> <i>P=0.0496</i>	<i>r=0.2373</i> <i>p=0.0403</i>
NTPDase – ADP	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>r=0.2763</i> <i>p=0.0144</i>
ADA	<i>r=0.1577</i> <i>p=0.0445</i>	<i>ns</i>	<i>r=0.3032</i> <i>p=0.0119</i>
AChE	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
SOD	<i>r=0.1675</i> <i>p=0.0422</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CAT	<i>r=0.1913</i> <i>p=0.0474</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

*YS: years of smoking

**QS: quantity of cigarettes smoked (packs/year)

****ns*: not significant

LEGENDS

Fig 1 NTPDase activity in the lymphocytes of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31) using ATP (A) and ADP as substrate (B). Results are expressed as mean±standard deviation

Fig 2 Percentage of CD39 positive cells from patients with lung cancer (n=10) when compared to the control group (n=10). The results were expressed as mean±standard deviation

Fig 3 ADA activity in the serum of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31). The results were expressed as mean±standard deviation

Fig 4 BChE activity in the serum of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31) (A) and AChE activity in the whole blood of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31) (B). Results are expressed as mean±standard deviation

Fig 5 SOD activity (A) and CAT activity (B) in the whole blood of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31). Results are expressed as mean±standard deviation

Fig 6 T-SH (A) and NPSH levels (B) in serum of patients with lung cancer (n=31) and healthy patients (n=31). Results are expressed as mean±standard deviation

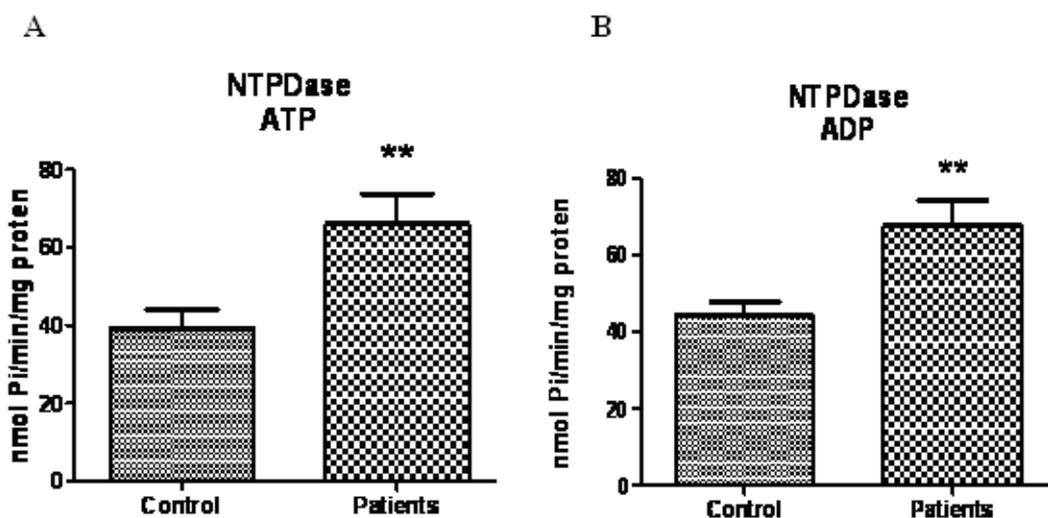


Fig 1

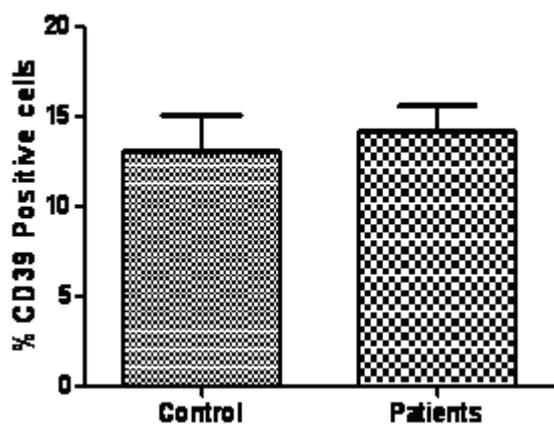


Fig 2

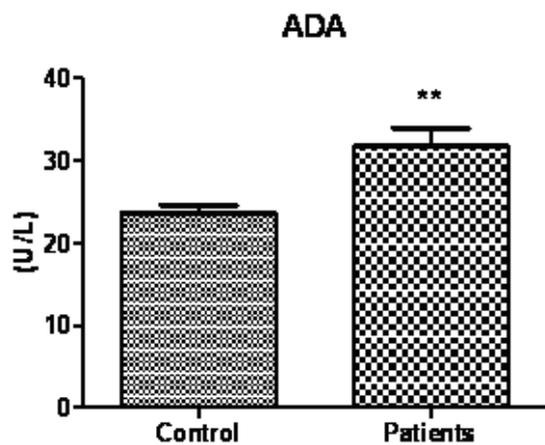


Fig 3

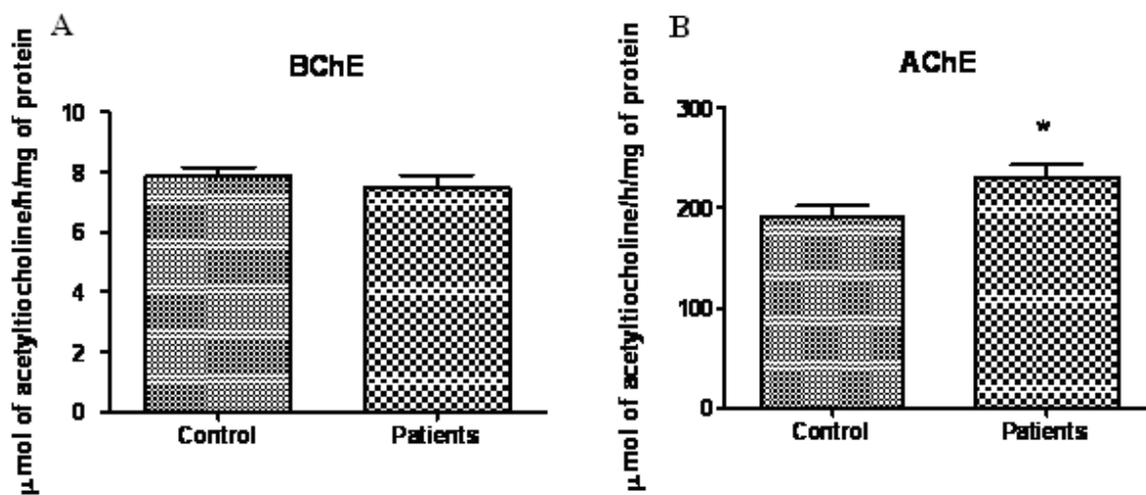


Fig 4

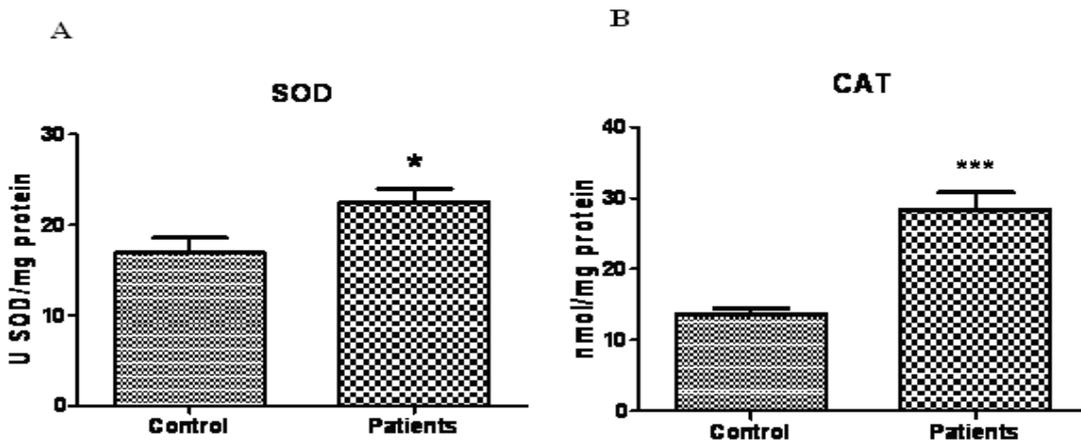


Fig 5

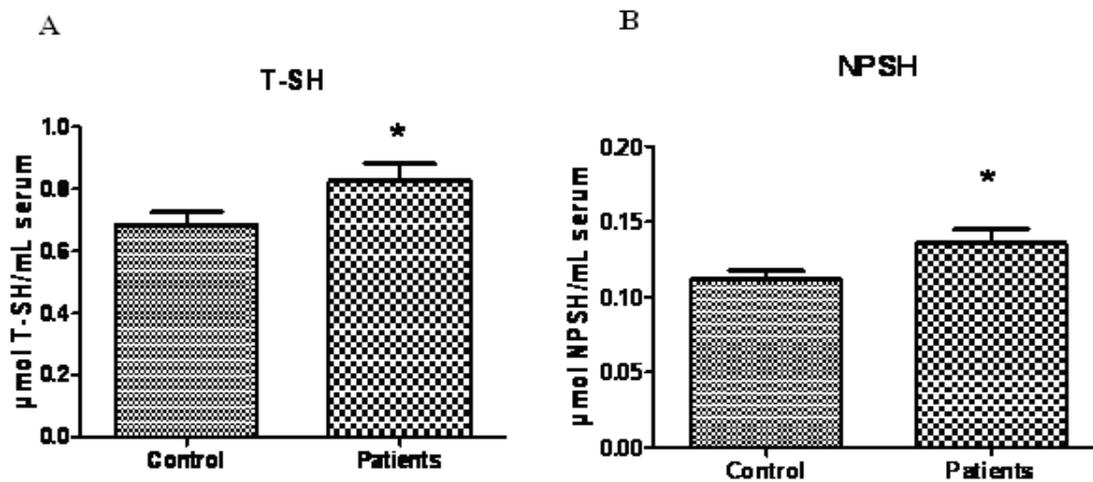


Fig 6

4 CONCLUSÃO

- ✓ A atividade da NTPDase, tanto para a hidrólise do ATP quando do ADP, em linfócitos de pacientes com câncer de pulmão foi significativamente maior em comparação com sua atividade nos pacientes controles. Esses resultados sugerem que os efeitos pró-inflamatórios desencadeados pelo ATP no meio extracelular podem estar diminuídos nos pacientes acometidos pela patologia.
- ✓ A atividade da ADA no soro de pacientes com neoplasia pulmonar foi significativamente aumentada em relação aos pacientes controles. Isto indica que a adenosina produzida pela hidrólise dos nucleotídeos de adenina é rapidamente consumida pela ADA, não exercendo, desse modo, seus efeitos anti-inflamatórios nos pacientes com câncer de pulmão.
- ✓ A atividade da AChE no sangue total apresentou-se significativamente aumentada em pacientes com câncer de pulmão em relação aos controles. A provável redução dos níveis sanguíneos de ACh evidenciada nessa situação provocaria uma redução dos efeitos anti-inflamatórios característicos dessa molécula nos pacientes. Em relação à atividade da BChE no soro, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo de pacientes e o grupo controle indicando que a atividade dessa enzima não seria alterada pela condição patológica.
- ✓ As atividades da SOD e da CAT no sangue total foram significativamente maiores no grupo de pacientes com câncer de pulmão em relação ao grupo controle. Isso indica que pode haver uma superprodução de EROs nos pacientes acometidos pela doença neoplásica quando comparados com o grupo de controle.
- ✓ O conteúdo de T-SH e NPSH no soro foi significativamente maior nos pacientes com câncer de pulmão do que no grupo controle. Esses resultados mostram que os compostos tiólicos podem estar atuando nas reações de detoxificação e proteção desses pacientes.

- ✓ Em conjunto esses resultados são muito importantes do ponto de vista clínico porque sugerem que o câncer de pulmão exerce uma importante alteração, tanto na atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico, quanto no perfil oxidativo dos pacientes acometidos por essa patologia, podendo os parâmetros mencionados neste estudo serem úteis para o monitoramento da patologia.

REFERÊNCIAS

ADAM, J. K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Immune responses in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 113-132, 2003.

ADINOLFI, E. et al. P2X7 receptor: Death or life? **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 219-227, 2005.

ALBERG, A. J.; BROCK, M. V.; SAMET, J. M. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 3175-3185, 2005.

AL-JAFARI, A. A.; KAMAL, M. A.; DUHAIMAN, A. S. The mode of inhibition of human erythrocyte membrane-bound acetyl - cholinesterase by cisplatin in vitro. **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 8, p. 281-289, 1995.

ALMEIDA, J. P. L.; SALDANHA, C. Nonneuronal cholinergic system in human erythrocytes: Biological role and clinical relevance. **Journal Membrane Biology**, v. 234, p. 227-234, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. ACS – **The history of cancer**. Disponível em: <www.cancer.org/cancer/cancerBasiscs/TheHisoryofcancer/index>. Acesso em 08 jan. 2012.

ARAÚJO, A. J. Tabagismo passivo. In: VIEGAS, C.A. **Tabagismo: do diagnóstico à saúde pública**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 37-75.

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.

AZAD, N.; ROJANASAKUL, Y.; VALLYATHAN, V. Inflammation and Lung Cancer: Roles of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2008.

BAKAN, N. et al. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia, **Clinica Chimica Acta**, v. 338, p. 143-149, 2003.

BARANKIEWICZ, J.; DOSCH, H. M.; COHEN, A. Extracellular nucleotide catabolism in human B and T lymphocytes: The source of adenosine production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 7094-7098, 1988.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 547-581, 1998.

BELOQUI, O. et al. Monocyte cyclooxygenase-2 overactivity: a new marker of subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors? **European Heart Journal**, v. 26, p. 153-158, 2005.

BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. In: WAITZBERG, D.L. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 1-87.

BIOGONESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v. 43, p. 5511-5519, 2004.

BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. **Advances in Immunology**, v. 86, p. 1-41, 2005.

BLOM, B.; SPITS, H. Development of human lymphoid cells. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 287-320, 2006.

BOING, A. F.; PERES, M. A.; ANTUNES, J. L. Mortality from oral and pharyngeal cancer in Brazil: trends and regional patterns, 1979-2002. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 2006.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **La Presse Médicale**, v. 15, p. 1174-1184, 2002.

BOURS, M. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 358-404, 2006.

BRAGANHOL, E. **Sistema purinérgico e a progressão dos gliomas**: avaliação de parâmetros proliferativos e inflamatórios. 2010. 243f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BRASIL. MS – Ministério da Saúde. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, 2010. **Atlas de Mortalidade por Câncer**. Disponível em: <www.datasus.gov.br>. Acesso em: 31 jan. 2012.

BRIGELIUS-FLOHE, R. et al. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 703-716, 2002.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling – an overview. **Novartis Foundation Symposium**, v. 276, p. 26-48, 2006.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 2, p. 659-797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 7, p. 575-590, 2008.

CAVENARI, R. A.; ROGATTO, S. R. Câncer de cabeça e pescoço. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.189-201.

CHEN, R. et al. Cancers take their Toll-the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. **Oncogene**, v. 27, p. 225-233, 2008.

COOK, J. A. et al. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Seminars in Radiation Oncology*, v. 14, p. 259-266, 2004.

COTE, M.L. et al. Meta and pooled analysis of GSTP1 polymorphism and lung cancer: a HuGE-GSEC review. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 7, p. 802-814, 2009.

DI VIRGILIO, F. Dr. Jekyll / Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, p. 59-63, 2000.

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

DUNWIDDIE, T.; MASINO, S. The role and regulation of adenisine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31-55, 2001.

EDGE, S. B. et al. **AJCC Cancer Staging Handbook**. 7. ed. New York: Springer, 2010.

ELSSNER, A. et al. Anovel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4987-4994, 2004.

ENJYOJI, K. et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v. 5, p. 1010-1017, 1999.

FARBER, J. L.; KYLE, M. E., COLEMANN, J. B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigation**, v. 62, p. 670-678, 1990.

FARIAS, I. L. G et al. Correlation between TBARS levels and glycolytic enzymes: The importance to the initial evaluation of clinical outcome of colorectal cancer patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 395-400, 2011.

FERNANDES, A.; JATENE, F. B.; ZAMBONI, M. Diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 28, n. 4, p. 219-228, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FISCHER D, et al. A role for adenosine deaminase in monocyte maturation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 58, p. 399-407, 1976.

FRANCO, M. et al. **Patologia dos processos gerais**. 5. ed. São Paulo: Ateneu, 2010.

GARROTE, L.F. et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 1, p. 46-54, 2001.

GATELY, S. The Contributions of Cyclooxygenase-2 to Tumor Angiogenesis. **Cancer And Metastasis Reviews**, v. 19, p. 19-27, 2000.

GESSI, K.; VARANI, S.; MERIGHI, S. Adenosine and lymphocyte regulation, **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 109-116, 2007.

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.

GUERRA, A. N. et al. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signalling and pathophysiology. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 4, p. 256-263, 2003.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. de M.; MENDONÇA, G. A. S. Riscos de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de Oncologia**. 2. ed. São Paulo: BBS Editora, 2006.

HACKSHAW, A.; LAW, M.; WALD, N. J. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. **British Medical Journal**, v. 315, p. 980-988, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999. p. 936.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford, 2000. p. 543.

HARIZI, H.; CORCUFF, J. B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, p. 461-469, 2008.

HARRIS, R. E. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. **Inflammopharmacology**, v. 17, p. 55-67, 2009.

HASKÓ, G. et al. A2B adenosine receptors in immunity and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 6, p. 263-270, 2009.

HASTÜRK, S. et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 94, p. 1023-1031, 2002.

HIDA, T. et al. Increased Expression of Cyclooxygenase 2 Occurs Frequently in Human Lung Cancers, Specifically in Adenocarcinomas. **Cancer Research**, v. 58, p. 3761-3764, 1998.

HUANG, R. Y.; CHEN, G. G. Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1815, p. 158-169, 2011.

HWANG, D. et al. Activation and inactivation of cyclo-oxygenase in rat alveolar macrophages by aqueous cigarette tar extracts. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 27, p. 673-682, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA – Ministério da Saúde. **Como é o processo de carcinogênese**. Disponível em: <www.inca.gov.br/conteudo_view>. Acesso em 10 jan. 2012a.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA – Ministério da Saúde. **Estadiamento**. Disponível em: <<www.inca.gov.br/conteudo_view>>. Acesso em 10 jan. 2012b.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA – Ministério da Saúde. **Estatísticas do câncer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em 10 jan. 2012c.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. IARC – **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: tobacco smoke and involuntary smoking**. France: IARC Press, v. 89, 2004.

JAMNIK, S. **Câncer de Pulmão e Tabagismo: os números**. Disponível em: <www.sociedadeclementeferreira.org.br/imagens/tabagismo_e_cancer>. Acesso em 15 jan. 2012.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69-90, 2011.

JORDÃO, A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

KAMAL, M. A.; NASIMB, F. H.; AL-JAFARI, A. A. Human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by cisdiamminediaquaplatinum (II): a novel kinetic approach. **Cancer Letters**, v. 138, p. 115-119, 1999.

KAROUI, H. et al. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite-ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 6000-6009, 1996.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 86, p. 29-48, 2000.

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.

KEITH, T. et al. Increased Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in Barrett's Esophagus and Associated Adenocarcinomas. **Cancer Research**, v. 58, p. 2929-2934, 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.

KUMAR, R. et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 8. ed. Philadelphia: Elsevier, 2010.

LANGSTON, H. et al. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LA SALA, A. et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 3, p. 339-343, 2003.

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9-15, 2005.

LÉCUYER, E.; HOANG, T. SCL: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 11-24, 2004.

LORENZI, T. **Manual de Hematologia, Propedêutica e Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 2, n. 2, 2º semestre 2002.

LUTHJE, J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. **Klinische Wochenschrift**, v. 67, p. 317-327, 1989.

MACFARLANE, G. J. et al. Alcohol, tobacco, diet and risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, v. 31, n. 3, p. 181-187, 1995.

MACKAY, J.; ERIKSEN, M. **The tobacco atlas**. Hong Kong: World Health Organization, 2002.

MALDONADO, P.A. 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.

MALMSJO, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGUE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. **European Journal of Pharmacology**, v. 390, p. 173-180, 2000.

MANTOVANI, G. et al. Cytokine activity in cancer-related anorexia/-cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate. **Seminars in Oncology**, v. 25, p. 45-52, 1998.

MARCUS, A. J. et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, p. 2497-2509, 2003.

MARTEY, C. A. et al. Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, p. 981-991, 2004.

MARTEY, C. A. et al. The aryl hydrocarbon receptor is a regulator of cigarette smoke induction of the cyclooxygenase and prostaglandin pathways in human lung fibroblasts. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 289, p. 391-399, 2005.

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.

MASUTANI, H. Oxidative stress response and signaling in hematological Malignancies and HIV infection, **International Journal of Hematology**, v. 71, p. 25-32, 2000.

MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MC CORD J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-60, 1983.

MENEZES, A.M.B. et al. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. 129-134, 2002.

MIRRA, A. P. Câncer e Tabagismo. In: VIEGAS, C. A. **Tabagismo: do diagnóstico à saúde pública**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 107-116.

MORA, P. A. R. **Análise de sobrevida de pacientes com câncer de pulmão**. 2004. 117f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

NIZRI, E. et al. Bifunctional compounds eliciting both anti-inflammatory and cholinergic activity as potential drugs for neuroinflammatory impairments. **Neuroscience Letters**, v. 376, p. 46-50, 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.

ODASHIMA, M. et al. Seletive adensine A receptor agonist, ATL-146e, attenuates stress-induced gastric lesions in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 2, p. 275-280, 2005.

OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, p. 976-984, 2002.

PARKIN, D. M. et al. Estimating the world cancer burden. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 2, p. 153-156, 2001.

PIKARSKY, E. et al. NF-kappa β functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, p. 461-466, 2004.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase E.C.3.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225-230, 1996.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: indentities and fuctions. **International Reviews of Cytology**, v. 158, p. 141-214, 1995.

PROFITA, M. et al. Chronic obstructive pulmonary disease andneutrophil infiltration: role of cigarette smoke and cyclooxygenase products. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 298, p. 261-269, 2010.

RAKONCZAY, Z. et al. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer´s disease. **Chemical Biological Interactions**, v.157-158, p. 233-238, 2005.

RANDALL, E. et al. Chemoprevention of Breast Cancer in Rats by Celecoxib, a Cyclooxygenase 2 Inhibitor. **Cancer Research**, v. 60, p. 2101-2103, 2000.

RATHBONE, M.P. et al. Adenosine and its nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells. **Neuroscience Research**, v. 13, p. 1-17, 1992.

RATHBONE, M. P. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, n. 6, p. 663-690, 1999.

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

RÖSCH, S. et al. Prostaglandin E2 induces cyclooxygenase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells through activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 1171-1178, 2005.

SANTOS, R. dos. **Câncer de pulmão: avaliação do emprego de medidas paliativas em um hospital terciário**. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SASCO, A. J.; SECRETAN, M. B.; STRAIF, K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. **Lung Cancer**, v. 45, n. 2, p. 3-9, 2004.

SCHMATZ, R. **Efeitos do resveratrol, do suco de uva e do vinho tinto nos biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade de ectoenzimas em ratos diabéticos**. 2011. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SEIZI, O. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. Editora Ateneu, 2003. p. 39-48.

SEVERO, I. M. **Alterações no modo de viver em idosos com câncer**. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SEVIGNY, J. **Topografia de membrana das diferentes famílias de enzimas que compõem o grupo das ectonucleotidases**. Disponível em: <www.crrl.ca/sevigny.html>. Acesso em 11 jan. 2012

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHI, J. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 17471-17478, 2001.

SHISSHODIA, S.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappa β activation: a question of life or death. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 28-40, 2002.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1998. p. 1314.

SIME, P. J.; O'REILLY, K. M. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. **Clinical Immunology**, v. 99, p. 308-319, 2001.

SMITH, W. L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **American Journal of Physiology**, v. 263, p. 181-191, 1992.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITD, R. M. Cyclooxygenase. Structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 145-182, 2000.

SOREQ, H. et al. Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 7907-7911, 1994.

SOUZA, P. da C. **Estudo da participação do colágeno V no câncer de pulmão, especificamente no carcinoma não de pequenas células**. 2011. 242f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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

SZELÉNYI, J.; PÁLDI-HARIS, P.; HOLLÁN, S. Changes in the cholinergic system of lymphocytes due to mitogenic stimulation. **Immunology Letters**, v. 16, p. 49-54, 1987.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, p. 1075-1081, 2003.

TAYEBATI, S. K. et al. Immunological and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 132, p. 147-155, 2002.

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.

TENEN, D. G. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 89-101, 2003.

THANNICKAL, V. J. et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis. **Annual Review of Medicine**, v. 55, p. 395-417, 2004.

TIAN, L.; CAI, Q.; WEI, H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 24, p. 1477, 1998.

TORRES, B. B. **Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica**. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

TOYOKUNI, S. et al. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters**, v. 358, p. 1-3, 1995.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico 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.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, v. 104, p. 25-85, 1998.

VENTURA, M. A.; THOMOPOULOS, P. ADP and ATP activate distinct signalling pathways in human promonocytic U-937 cells differentiated with 1,25-dihydroxy-vitamin D3. **Molecular Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 104-114, 1995.

WANG, M. T.; HONN, K. V.; NIE, D. Cyclooxygenases prostanoids, and tumor progression. **Cancer Metastasis Review**, v. 26, p. 525-534, 2007.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. **Oncogene**, v. 29, p. 781-788, 2010.

WANG, Y. et al. Association between CYP2E1 genetic polymorphisms and lung cancer risk: A meta-analysis. **European Journal of Cancer**, v. 46, p. 758-764, 2010.

WESCOE, W. C. et al. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **American Journal of Physiology**, v. 149, p. 549-551, 1947.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends in Pharmacological Science**, v. 27, n. 4, p. 211-217, 2006.

WU, L. L. et al. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics, **Clinica Chimica Acta**, v. 339, p. 1-9, 2004.

YEGUTKIN, G. G. et al. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. **Biochemical Journal**, v. 367, p. 121-128, 2002.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research**, v. 1758, n. 5, p. 673-694, 2008.

ZAMBONI, M. Epidemiologia do câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 1, 2002.

ZANDER, D. S. et al. **Molecular pathology of lung disease**. New York: Springer, 2008.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 161-178, 2008.

ZIMMERMANN, H. Signalling via ATP in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 17, n. 10, p. 420-426, 1994.

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in haemostasis and thrombosis. **Nature Medicine**, v. 5, p. 987-988, 1999.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

1. Qual é sua idade?
 2. Sexo: () Masculino () Feminino
 3. Qual é sua profissão? (Investigar a exposição a algum fator de risco)
 4. No local em que você mora há muitos veículos automotores circulantes e/ou indústrias que emitam gases poluentes na atmosfera?
() Sim () Não
 5. Você já trabalhou em indústrias, em fábricas de vidros ou com moagem de pedras?
() Sim () Não
 6. Você já trabalhou com aplicação de inseticidas em lavouras?
() Sim () Não
 7. Você é fumante?
() Sim () Não
- Se o paciente responder SIM:
8. Por quanto tempo você fumou ou fuma?
 9. Quantos cigarros você fumava ou fuma?
 10. Com que idade começou a fumar?
- Se o paciente não fuma mais:
11. Quanto tempo faz que você não fuma mais?
 12. Você convive com algum fumante?
() Sim () Não
 13. Você tem familiares que apresentaram ou apresentam câncer de pulmão?
() Sim () Não
 14. Você tem familiares que apresentaram ou apresentam algum outro tipo de câncer?
() Sim () Não
 15. Quais medicamentos você usa?

APÊNDICE B

Dados complementares da população estudada

Gênero	Dados numéricos
Homens	20 (65%)
Mulheres	11 (35%)
Profissão	
Agricultor	11 (35%)
Doméstica	09 (29%)
Mecânico	04 (13%)
Ajudante na construção civil	03 (10%)
Outras	04 (13%)
Tabagismo ativo	
Homens	20 (100%)
Mulheres	09 (82%)
Tabagismo passivo	
Homens	17 (85%)
Mulheres	07 (64%)
Idade que começou a fumar	
	Média: 16 anos Mais novo: 6 anos Mais velho: 20 anos
Tempo de tabagismo	
	Média: 42,5 anos
Casos de câncer de pulmão na família	
	04 (13%)
Outros tipos de câncer na família	
	12 (39%)

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “Avaliação da hidrólise de nucleotídeos e do perfil oxidativo em pacientes com câncer de pulmão”.

Pesquisador responsável: Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger

Instituição/ Departamento: Universidade Federal de Santa Maria – Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica.

Telefone para contato: (55) 3220-9557

Você está sendo convidado a participar como paciente ou como controle da pesquisa “AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS E DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO”.

Sua participação não é obrigatória, não haverá nenhuma forma de compensação financeira e não haverá nenhum custo para você.

O principal objetivo deste estudo é investigar a atividade das proteínas, no sangue, que estão relacionadas aos danos provocados pelo câncer de pulmão, nos pacientes que são atendidos no setor de Hematologia/Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria.

O fato de você participar de nosso estudo implicará somente na coleta de uma amostra de 15 mL de sangue e na resposta de alguns questionamentos que poderão elucidar fatores relacionados com o desenvolvimento da doença. Este procedimento foi previamente acordado com o médico Oncologista Dr. Juarez Chiesa.

O desconforto se resume à picada da agulha, sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxeadado, mas não requer nenhum cuidado especial, voltando ao normal em poucos dias. O sangue será destinado para análises bioquímicas.

Sua participação contribuirá com o estudo científico do câncer de pulmão e dos mecanismos envolvidos nas suas complicações. Isto contribuirá para a tentativa de evitar estas complicações e melhorar a qualidade de vida do paciente com câncer.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação agora ou a qualquer momento.

Eu, (assinatura do(a) participante da pesquisa), RG nº:declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger (Pesquisadora Responsável)

mariaschetinger@gmail.com

Qualquer dúvida entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa: Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702 Cidade Universitária – Bairro Camobi - 97105-900 - Santa Maria – RS-Tel.: (55)32209362 - e-mail: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br.