

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

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA ATIVIDADE
DE ECTOENZIMAS EM PACIENTES COM NEOPLASIA
INTRA-EPITELIAL CERVICAL**

TESE DE DOUTORADO

Paula Acosta Maldonado

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA ATIVIDADE DE
ECTOENZIMAS EM PACIENTES COM NEOPLASIA INTRA-
EPITELIAL CERVICAL**

por

Paula Acosta Maldonado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em
Enzimologia Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Bioquímica Toxicológica.

Orientadora: Prof. (Dra) Maria Rosa Chitolina Schetinger

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

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

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

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA ATIVIDADE DE
ECTOENZIMAS EM PACIENTES COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL
CERVICAL**

elaborada por
Paula Acosta Maldonado

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Maria Rosa Chitolina Schetinger
Cristina Nogueira
Maurício Reis Bogo
Maribel Antonelo Rubin
Marilise Escobar Burger**

Santa Maria, 22 de agosto de 2008

Esta tese é dedicada aos meus pais
amados Paulo e Norma Maldonado.

Agradecimentos:

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus QUERIDOS pais Paulo e Norma Maldonado por fazerem de mim o que sou hoje, por sempre terem me proporcionado todas as oportunidades e realizado todos os meus sonhos, quero dizer que sem vocês eu nada seria, eu os amo muito.

Agradecer ao meu irmão, Márcio Maldonado, o orgulho da minha vida, muito obrigada por me ajudar sempre, me apoiando, me incentivando desde nossa infância até hoje, meu amor por ti é do tamanho do mundo.

Ao meu noivo Luiz Augusto...Nê obrigada pelo amor, paciência, carinho e por estar comigo em todos os momentos me ajudando a perseguir meus sonhos, TE AMO PARA SEMPRE, VOCÊ É O MEU TESOURO.

À Nil por cuidar de mim desde pequena, por vibrar pelas minhas conquistas e por todas as manhãs antes de eu sair de casa para ir a faculdade me desejar: “vá com Deus”.

A minha orientadora a Prof. Maria Rosa, ou Rosinha como carinhosamente todos à chamam, por ter me acolhido no seu laboratório mesmo sem me conhecer, por ser responsável por grande parte do meu crescimento intelectual, só tenho a agradecer e dizer que ela ficará guardada em meu coração para sempre onde quer que eu vá. À prof. Vera por também permitir que eu fizesse parte de seu grupo de pesquisa.

À minha pipoca, Larinha, minha IC, minha amiga e irmã, um anjo que Deus colocou no meu caminho, jamais esquecerei a frase que você me diz a todo o momento: “podes contar comigo sempre” e isso é a mais pura verdade, te adoro.

A minha querida Maísa, minha irmã-amiga também, esse exemplo de bondade, alegria e o espírito de ajudar aos demais sempre, te amo. Ao Gilberto e a Dani amigos que Deus colocou no meu caminho. Aos meus colegas e amigos que fiz no lab.2208, a Rosélia que me ensinou a fazer meu 1º TBARS, a cintinha essa fofote, ao Ahmed esse amigo internacional, ao Rafa e ao André meus “apirase teachers”, a Vanessinha, a Liési, a Carol, a Karen, a Cíntia, a Roberta, ao Jessié, ao Gustavo, a Naiara, a Juci, a Amanda, a Marga e a todos os outros os quais vou levar para sempre no meu coração por todos os momentos vividos juntos.

“A felicidade suprema na vida é a
convicção de que somos amados”
VICTOR HUGO, Os *Miseráveis*

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS EM PACIENTES COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL

AUTORA: PAULA ACOSTA MALDONADO
ORIENTADORA: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de agosto de 2008.

Os carcinomas uterinos despontam como uma das doenças malignas mais importantes do trato genital feminino, precedido apenas pelo câncer de mama. As células tumorais podem originar distúrbios oxidativos, bem como prejuízo das defesas antioxidantes desses pacientes. O câncer também pode induzir alterações na coagulação sanguínea que vão desde uma pequena ativação plaquetária até a formação de trombos na circulação, os quais prejudicam a qualidade de vida desses pacientes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do carcinoma cervical uterino e de tratamentos como a conização (CNZ) e a radioterapia (RTX) sobre o possível desenvolvimento de processos trombogênicos, sobre o perfil oxidativo e sobre os distúrbios da coagulação. As variações no perfil oxidativo foram analisadas pela determinação de parâmetros como o conteúdo de TBARS e de proteína carbonil, e as defesas antioxidantes através da atividade da enzima catalase e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). As desordens tromboembólicas foram analisadas pela determinação da atividade de enzimas como a NTPDase, a E-NPP e a 5'-nucleotidase, enzimas presentes na membrana plaquetária, bem como através da atividade da enzima ADA a qual tem a importante função na degradação da adenosina, que reconhecidamente desempenha funções promotoras de tumor. A avaliação dos parâmetros oxidativos e antioxidantes revelou que os níveis de TBARS, de proteína carbonil, de GSH e a atividade da enzima catalase estavam aumentados no grupo de pacientes não tratados em relação aos demais grupos. O aumentado nível de oxidantes pode ser reflexo de um aumento na sua produção pela célula tumoral. Os antioxidantes podem estar aumentados possivelmente por estar no início da transformação neoplásica tumoral na tentativa de compensar o aumento da produção de espécies reativas. Com relação às enzimas envolvidas nos processos tromboembólicos, os resultados revelaram que ocorreu uma inibição significativa da enzima NTPDase nos grupos tratados há mais tempo tanto por CNZ quanto por RTX, em relação aos grupos tratados recentemente e em relação ao grupo controle. A reduzida hidrólise do ATP poderia estar atuando como forma de prevenção contra a formação do ADP, visto que este nucleotídeo é o principal agente promotor da agregação plaquetária. No caso da

enzima 5'-nucleotidase observamos uma reduzida hidrólise do AMP, em todos os grupos tratados, que pode ser o resultado da reduzida produção de adenosina pela efetividade dos tratamentos. Em todos os grupos tratados por CNZ e RTX a atividade da E-NPP, tanto em soro quanto em plaquetas, estava reduzida em relação ao grupo controle e ao grupo com neoplasia não-tratada, podendo ser o reflexo da reduzida degradação de nucleotídeos, pela ausência das células tumorais, formando menos adenosina, a qual é um agente promotor de tumor e também o substrato para a ADA. A ausência de células tumorais pela efetividade dos tratamentos e a reduzida concentração de adenosina, pode ser responsável pela reduzida atividade da ADA nos mesmos grupos. A inibição da atividade das enzimas E-NPP, 5'-nucleotidase e da ADA nos grupos tratados, pode sugerir o papel dessas enzimas no controle seqüencial das concentrações de nucleotídeos no meio extracelular. A enzima NTPDase parece ser um pouco mais sensível às mudanças provocadas pelo tempo transcorrido após o término dos tratamentos. Pode-se inferir também, que a cirurgia causa maiores alterações nas enzimas E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA de plaquetas, pelo fato de que nos grupos tratados recentemente por CNZ estas atividades encontram-se aumentadas em relação grupo tratado recentemente por RTX. Sugere-se, com esses resultados, que há uma possível alteração nas plaquetas, causada pelo processo cirúrgico, o qual seria o responsável pelas modificações enzimáticas observadas e que os tratamentos foram efetivos em combater as células tumorais uma vez que, de uma maneira geral há uma inibição das atividades das enzimas em questão, e também devido ao fato de que os testes de coagulação, possíveis indicadores de trombose associada ao câncer, não demonstraram-se alterados. Corroborando estes achados os exames citopatológicos apresentaram alterações celulares compatíveis com a normalidade. A enzima NTPDase demonstra-se estar envolvida no controle da agregação plaquetária e as enzimas 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA parecem estar mais envolvidas no controle dos níveis de adenosina.

Palavras-chave: Câncer de útero, radioterapia, conização, estresse oxidativo, plaquetas, trombose, NTPDase, E-NPP, ADA.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Programme of post graduation in biological sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS PROFILE AND ACTIVITY OF ECTO-ENZYMES IN PATIENTS WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA

AUTHOR: PAULA ACOSTA MALDONADO

ADVISOR: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Date and place of the defense: Santa Maria, 22 august 2008.

Uterine cancers are considered to be one of the most important malignant diseases of the female genital tract, preceded only by breast cancer. The tumor cells may produce oxidative disturbances as well as damage to the antioxidant system. Cancer may also induce alterations in blood coagulation, ranging anywhere from slight platelet activation to thrombus formation, which impair the quality of life of these patients. This study aimed to evaluate the influence of uterine cervix cancer and its treatments, such as conization and radiotherapy (RTX), on the possible development of thrombogenic processes, on the oxidative profile and on coagulation disorders. Variations in the oxidative profile were analyzed through the determination of parameters such as TBARS and protein carbonyl content and antioxidant defenses were determined from the activity of catalase and reduced glutathione (GSH). Thromboembolic disorders were evaluated by the activity of enzymes such as NTPDase, E-NPP and 5'-nucleotidase, since all of these are present in the platelet membrane, as well as the activity of ADA which has an important role in the degradation of adenosine, which in turn is known for possessing tumor promoting functions. The evaluation of oxidative and antioxidant parameters revealed that TBARS levels, protein carbonyl, GSH and the activity of catalase were enhanced in the non treated group when compared to the other groups. The increased levels of oxidants may reflect their enhanced production by tumor cells, since it is known that antioxidant levels are enhanced at the beginning of the neoplastic transformation in an attempt to neutralize the enhanced free radical production. As for the enzymes involved in the thrombogenic process, the results revealed a significant inhibition of NTPDase in groups treated for a long time ago by CNZ or RTX, when compared to the more recently treated groups and the control. The reduced ATP hydrolysis could be acting to prevent ADP formation, since this nucleotide is the main agent that promotes platelet aggregation. The reduced AMP hydrolysis in all the treated groups, may be a result of the reduced production of adenosine due to the effectiveness of the treatments. In the conization and RTX treated groups, E-NPP activity, both in serum and platelets, was reduced when compared to the control and non treated groups, which could be a reflection of reduced nucleotide degradation, due to the absence of tumor cells and, in turn, lower production of adenosine, which is a tumor promoting agent and is also the substrate for ADA. The probable absence of tumor cells due to the effectiveness of the treatments and the

reduced adenosine concentration may be responsible for the reduced ADA activity found in the same groups. The inhibition of enzymes such as E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA in all the treated groups may suggest the role of these enzymes in sequentially controlling the concentrations of nucleotides in the extracellular environment. NTPDase appears to be more sensitive to changes caused by the passing of time after the end of the treatments. We may say that the surgery itself causes greater alterations in enzymes such as E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA from platelets, because in the groups recently treated by CNZ these activities were enhanced as compared with the group recently treated by RTX, possibly as a result of platelet alteration, which would be responsible for the enzymatic alterations observed. NTPDase is more involved in the control of platelet aggregation and the enzymes 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA are more involved in controlling adenosine concentrations.

Keywords: Uterine cancer, radiotherapy, conization, oxidative stress, platelets, thrombosis, NTPDase, E-NPP, ADA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1- Anatomia uterina.....19

Artigo 2

Figure 1- ATP hydrolysis from patients treated with conization surgery (1A) and RTX (1B).....77

Figure 2- ADP hydrolysis from patients treated with conization surgery (2B) and RTX (2B).....78

Figure 3- AMP hydrolysis from patients treated with conization surgery (3A) and RTX (3B).....79

Figure 4- AMP hydrolysis comparison by test-t in conization (group II) and radiotherapy (group IV) recently treated groups.....80

Artigo 3

Figure 1A- E-NPP activity in the platelets of patients treated with conization (I, II) or RTX (III, IV) and cancer group87

Figure 1B- E-NPP activity in the serum of patients treated with conization (I, II) or RTX (III, IV) and cancer group87

Figure 2A- ADA activity in the platelets of patients treated with conization (I, II) or RTX (III, IV) and patients from the cancer group.....87

Figure 2B- ADA activity in the serum of patients treated with conization (I, II) or RTX (III, IV) and patients from the cancer group.....87

Figure 3A- Pearson's correlation between ADA and E-NPP in the platelets.....88

Figure 3B- Pearson's correlation between E-NPP in the serum and E-NPP in the platelets88

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Quadro 1- Classificação dos carcinomas uterinos.....21

Artigo 1

TABLE 1- General characteristics of the patients.....51

TABLE 2- Circulating pro-oxidants and antioxidant levels in cervical cancer patients and normal subjects.....52

Artigo 2

TABLE 1-General classification of the patients.....81

TABLE 2-Partial thromboplastin (APTT) and prothrombin (PT) times, platelets, white blood cells and hematocrit count and cytology screening.....82

TABLE 3- Platelet aggregation profile.....83

Artigo 3

TABLE 1- Coagulation parameters87

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA-adenosina deaminase

ADP- adenosina difosfato

AMP- adenosina monofosfato

ANOVA- análise de variância

APTT- tempo de tromboplastina parcial ativada

ATP- adenosina trifosfato

CNZ- conização

E-NPP- Ectonucleotideo pirofosfatase/fosfodiesterase

FIGO- International Federation of Gynecology and Obstetrics

GSH- glutationa reduzida

HGSIL- high grade squamous intraepithelial lesion

HPV- papilomavirus humano

LDH- lactato desidrogenase

MDA- malondialdeído

NIC- neoplasia intra-epitelial cervical

NTPDase- ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

PRP-plasma rico em plaquetas

PT- tempo de protrombina

p-Nph-5'-TMP-p-nitrofenil 5'-timidina monofosfato

ROS- reactive oxigen species

RTX- radioterapia

TBARS- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 CÂNCER DE ÚTERO	19
3. ESTRESSE OXIDATIVO	25
3.1 Radicais livres e defesas antioxidantes	25
3.2 Glutathiona reduzida.....	27
3.3 Catalase.....	29
3.4 Oxidação protéica.....	30
3.5 Lipoperoxidação.....	31
3.6 Estresse oxidativo e câncer.....	33
4. NUCLEOSÍDEOS E NUCLEOTÍDEOS	35
5. A FAMÍLIA DAS ECTOENZIMAS	37
5.1 NTPDase e 5'-nucleotidase	38
5.2 Ecto-nucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase	41
5.3 Adenosina deaminase	44
6. TROMBOSE E CÂNCER	46
APRESENTAÇÃO	49
7. ARTIGOS CIENTÍFICOS	50
7.1- Artigo 1: Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia	50
7.2- Artigo 2: Nucleotide degrading enzymes in platelets from patients treated with conization or radiotherapy for uterine cervix neoplasia	56
7.3- Artigo 3: Ecto-Nucleoside Pirophosphatase/ Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia	84
8. DISCUSSÃO	92
9. CONCLUSÕES	99
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma cervical é a doença maligna que mais afeta mulheres no mundo. Atualmente, verifica-se uma diminuição da incidência deste tipo de carcinoma em virtude do maior acesso das pacientes a exames preventivos de rotina (teste de Papanicolau), o que torna possível detectar precocemente o aparecimento de lesões que possam vir a tornarem-se malignas (JAMESON et al., 2002).

A relação entre o câncer e a presença de processos oxidativos há muito é relatada na literatura. As células tumorais são reconhecidamente as maiores responsáveis pela produção e liberação de oxidantes na circulação. Na maioria dos casos, há um decréscimo das defesas antioxidantes na tentativa de recuperar o balanço oxidativo celular e compensar o excesso de radicais livres lançados na circulação (KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004).

Os radicais livres podem gerar danos irreversíveis a biomoléculas importantes como os lipídios de membrana, as proteínas e o DNA. O dano a lipídios pode ser avaliado pelos níveis de um dos seus produtos de lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA), enquanto que o dano a proteínas pode ser determinado através da carbonilação protéica, sendo este um ótimo biomarcador de dano oxidativo à proteínas. Esse marcador apresenta uma boa estabilidade tanto em termos de armazenamento, como pelo fato de que seus níveis encontram-se elevados por um longo período de tempo na circulação (DALLE-DONNE et al., 2003; DALLE-DONNE et al., 2003). A enzima catalase e os níveis de tióis (GSH) são indicadores de função antioxidante bastante utilizados na prática, e várias são as evidências de que esses dois parâmetros encontram-se alterados na vigência de uma doença maligna (KUMARAGURUPARAN et al., 2002; MANJU et al., 2002; MANOHARAM et al., 2004; MILA-KIERZENKOWSKA et al., 2004; KUMARAGURUPARAN et al., 2005).

De uma maneira geral, as doenças malignas freqüentemente podem desencadear o aparecimento de processos tromboembólicos na circulação. Na grande maioria dos casos, a própria célula tumoral é responsável pelo estabelecimento do estado de hipercoagulabilidade associado ao câncer. As células tumorais secretam

fatores responsáveis por ativar o sistema de coagulação sanguínea desencadeando episódios de trombose arterial como também, mais comumente, a trombose venosa (PRANDONI et al., 1999; BICK, 2003; PRANDONI et al., 2005).

Os nucleotídeos, como o ADP, são capazes de induzir a agregação plaquetária, a qual pode ser responsável pela formação de trombos na circulação. O ATP está envolvido em processos inflamatórios, desempenhando funções na agregação de plaquetas, dependendo da sua concentração e de sua ligação a receptores específicos (BOURS et al., 2006).

A adenosina é um nucleosídeo reconhecido por promover a vasodilatação e, dessa forma, funciona como proteção contra a ativação descontrolada de plaquetas. Por outro lado, a adenosina, tem importantes funções que favorecem o desenvolvimento das células tumorais, como a neovasculogênese e a citoproteção (SPYCHALA, 2000).

Muitas vezes, devido ao rápido crescimento, os tumores enfrentam hipóxia severa (baixos suprimentos de oxigênio), a qual causa a degradação desses nucleotídeos na circulação. O controle das concentrações dessas moléculas no meio extracelular é feito por uma classe de enzimas as quais contêm seu sítio catalítico voltado para este meio. A NTPDase é uma enzima responsável pela desfosforilação de nucleotídeos como o ATP, levando a formação de ADP e, subseqüentemente, o ADP formado é desfosforilado formando o AMP. A enzima E-NPP também hidrolisa o ATP e o ADP, além de outros nucleotídeos, levando à produção de nucleotídeos monofosfato. A enzima 5'-nucleotidase, da mesma forma, compõe esta seqüência enzimática hidrolisando o AMP à adenosina. Finalizando esta cadeia de reações a enzima adenosina deaminase é responsável pela degradação da adenosina até inosina (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008)

Devido ao fato de que estas ectoenzimas medeiam muitos aspectos da função celular, desde o controle dos eventos pró-agregatórios até processos pró-inflamatórios e, em razão da importância do estresse oxidativo em associação a processos malignos, considera-se relevante à avaliação destes dois aspectos das funções celulares num grupo de pacientes portadoras de neoplasias cervicais uterinas, as quais representam uma das afecções ginecológicas malignas mais comuns em mulheres.

1.1 OBJETIVOS:

Duas vertentes das doenças de caráter maligno são: a presença de radicais livres na circulação e a presença das ectoenzimas atuando na degradação de nucleotídeos mediadores de importantes respostas no meio extracelular. Além disso, a adoção de determinados tratamentos pode direta ou indiretamente contribuir para a exacerbação de determinadas respostas celulares indesejáveis, bem como pode não ser integralmente efetiva no combate às células tumorais. Sendo assim, devido à relevância clínica dos fatos supracitados este estudo teve por objetivos:

1. Avaliar indicadores do perfil oxidante e antioxidante de pacientes portadores de neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau. Verificar também o efeito de tratamentos como a CNZ e a RTX sobre os mesmos indicadores de estresse oxidativo.

2. Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA nas referidas pacientes e também o efeito dos tratamentos anteriormente citados sobre a atividade das enzimas em questão.

3. Avaliar os parâmetros de coagulação sangüínea tais como: os tempos de pró-trombina e tromboplastina parcial ativada, a contagem de plaquetas e o perfil de agregação plaquetária no sentido de verificar seu potencial como indicadores de processos trombogênicos e possíveis recidivas tumorais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE ÚTERO

O útero é um importante órgão pélvico, com funções reprodutivas, atuando na manutenção da gravidez e cujo epitélio descama a cada ciclo menstrual. Este órgão é dividido em três principais porções: o cérvix ou colo do útero, o miométrio e o endométrio. A principal porção é composta de musculatura lisa propiciando o espessamento da parede uterina. O interior do útero é formado por epitélio glandular sustentado pelo estroma endometrial. Juntos, o epitélio glandular e o estroma endometrial são referidos como endométrio. Esta porção é sensível à mudanças durante o ciclo menstrual e durante a gravidez (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2002; RICH, 2007). O colo do útero (ou cérvix) é a porção fibromuscular do órgão. Tem formato cilíndrico ou cônico e mede de 3 à 4 cm de comprimento e 2.5 cm de diâmetro (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 2006). Cada uma das três porções que compõem a estrutura uterina pode originar diferentes tipos de carcinomas (DOLINSKY, 2002) (figura 1).

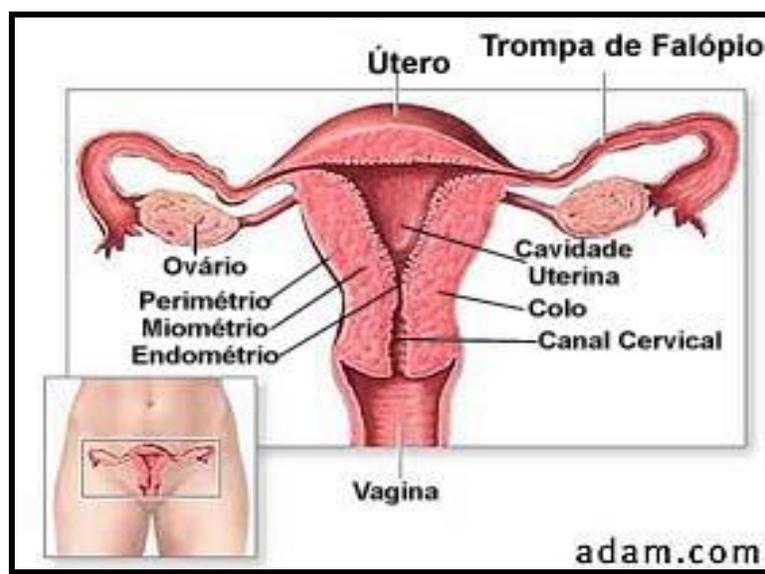


Figura 1- Anatomia uterina. Fonte: www.adam.com

No mundo, o carcinoma cervical é o sétimo em frequência, com uma estimativa de aproximadamente 493.000 novos casos ao ano e 274.000 mortes no ano de 2002. Ele é a segunda neoplasia incidente na mulher, perdendo a primeira posição somente para o câncer de mama, tanto no que diz respeito à mortalidade quanto à incidência. A mortalidade e a incidência levam em consideração fatores como a existência de programas que orientem a respeito da prevenção da doença, bem como o livre acesso das pacientes a exames periódicos de controle (JANICEK & AVERETTE, 2001; NOVAES et al., 2006).

O carcinoma cervical é mais comum em países em desenvolvimento, onde ocorrem 83% dos casos e onde ele colabora com 15% dos cânceres em mulheres (PARKIN et al., 2005; SANKARANARAYANAN, 2006). Isto se deve principalmente à dificuldade de implantação e divulgação de medidas preventivas nesses países (JANICEK & AVERETTE, 2001). Já em países desenvolvidos, o câncer cervical contribui com apenas 3,6% dos novos casos de cânceres (PARKIN et al., 2005; SANKARANARAYANAN, 2006).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 demonstram um número de 18.680 novos casos de câncer de colo de útero, com um risco de 19 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sul, esse tipo de câncer ocupa a 2^a posição em frequência com uma incidência de cerca de 24 novos casos a cada 100 mil mulheres (INCA-Estimativa 2008).

Segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) os carcinomas uterinos são classificados basicamente em 4 estágios, sendo os estágios iniciais considerados de baixo grau, enquanto que os demais são considerados lesões de alto grau. As normas para a correta classificação dos carcinomas uterinos estão resumidamente indicadas no quadro 1 (BENEDET et al., 2000).

Estágios do carcinoma	Aspecto da lesão
Zero	Carcinoma <i>in situ</i>
Estágio I- Câncer cervical confinado ao útero	IA- Carcinoma invasivo em nível microscópico
	IB- Lesão visível clinicamente, confinada ao colo
Estágio II	Tumor microinvasivo
Estágio III	Tumor na parede pélvica
Estágio IV	IVA- Invasão da bexiga ou reto
	IVB- Metástases distantes

Quadro 1- Classificação dos carcinomas uterinos. Adaptado de IARC, 2006

A detecção precoce do câncer de colo de útero permite evitar ou retardar a sua progressão para doença invasiva. Esta detecção pode ser realizada pelo exame colposcópico, pela própria biópsia, pela excisão local, por conização e eventualmente, fazendo uso da histerectomia (ANDRADE, 2001). O carcinoma localizado no colo uterino, muitas vezes não apresenta sintomas clínicos perceptíveis de início, mas com o passar do tempo a paciente pode apresentar sintomas como sangramento vaginal ou dores na região pélvica (MEDLINE PLUS, 2007).

Entre os fatores de risco para o câncer cervical, a infecção por HPV desponta como um dos principais agentes causadores, porém, isoladamente, este não é capaz de desencadear a doença. O HPV é perfeitamente adaptado ao tecido do hospedeiro. As partículas virais consistem de 8000 pares de bases de DNA circular e pelo menos 6 proteínas denominadas proteínas jovens (E1, E2, E4-E7) que são necessárias para a replicação viral. Embora as mulheres adquiram infecções por HPV, a maioria não necessariamente progride para o câncer cervical. Uma quantidade de cofatores precisa estar presente para que ocorra o desenvolvimento do processo da doença. Três grupos de potenciais fatores associados incluem: 1) fatores ambientais ou exógenos como o uso de contraceptivos, tabagismo e paridade, 2) cofatores virais como a infecção por tipos específicos de vírus, a carga viral, co-infecção com outro tipo de HPV, 3) fatores do próprio hospedeiro, que incluem hormônios endógenos, fatores genéticos e outros fatores relacionados à resposta imune (MUÑOZ et al., 2006). Outros fatores de risco

conhecidos para este tipo de câncer são: o início precoce da vida sexual, história de múltiplos parceiros sexuais, o tabagismo, a etnia e a baixa classe social (JANICEK & AVERETTE, 2001; WWW.MEDLINEPLUS, 2005).

As neoplasias invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva. Os primeiros relatos de lesões precursoras da neoplasia de colo uterino ocorreram quando foram visualizadas áreas de alterações epiteliais atípicas, não-invasivas, identificadas em amostras teciduais adjacentes às neoplasias invasivas (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 2006).

Em 1932, o termo carcinoma *in situ* (CIS) foi introduzido para identificar as lesões em que as células carcinomatosas indiferenciadas ocupavam a espessura total do epitélio, sem a ruptura da membrana basal. O termo neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) foi introduzido em 1968 para indicar as atípicas celulares confinadas ao epitélio, sendo dividida em graus 1, 2 e 3 correspondendo a displasias leves, moderadas e graves, respectivamente (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 2006).

Em 1988, foi originalmente proposto o sistema de BETHESDA para a descrição dos achados dos esfregaços de Papanicolau e, hoje em dia, este é o sistema de nomenclatura mais aceito. Este sistema traz três maiores mudanças:

1. Alterações causadas por HPV e displasias leves (NIC I) foram combinadas na categoria LGSIL (Neoplasia Intra-Epitelial de Baixo Grau).
2. Displasias moderadas, severas e carcinoma *in situ* foram inseridas na categoria da HGSIL (Neoplasia Escamosa Intra-Epitelial de Alto Grau)
3. Um novo termo "ASCUS" (células escamosas atípicas de significância indeterminada) foi introduzido (JANICEK & AVERETTE, 2001).

Em termos de medidas cautelares, o carcinoma cervical invasor pode ser prevenido pela detecção precoce e tratamento destas neoplasias intra-epiteliais de graus 2 e 3 (QUIN, 2007). O teste comumente usado como rastreamento da doença inclui o exame citopatológico constituído pela coleta de material para o exame microscópico, fazendo uso de um esfregaço citológico corado pela técnica de Papanicolau (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 2006). Uma vez que se suspeita de neoplasia realiza-se o exame colposcópico, que consiste na

avaliação do cérvix ou colo uterino sob aumento, com o intuito de localizar a possível anormalidade. Além destes exames, em alguns casos onde a suspeita de lesões malignas torna-se mais evidente, é realizada a biópsia cervical (MEDLINEPLUS, 2007).

As lesões pré-neoplásicas e as microinvasivas são assintomáticas, apresentando, eventualmente, sangramento espontâneo ou pós-coital. Nesses casos, dependendo principalmente do estágio clínico da doença, é que serão instituídos os diferentes tipos de tratamentos (ANDRADE, 2001). A escolha do tratamento ideal dependerá do protocolo individual de cada instituição de saúde, levando em consideração fatores como o estágio da doença, além da idade e as condições gerais da paciente.

Os tratamentos usualmente combinam a cirurgia e a radioterapia (RTX). A cirurgia, de uma maneira geral, é geralmente empregada nos estágios iniciais dos cânceres cervicais. As doenças em estágios avançados são usualmente tratadas com radiação e quimioterapia, porém algumas vezes a cirurgia é empregada se houver recidiva do câncer cervical após o tratamento.

A conização (CNZ) é um método conservativo usado para remover a zona neoplásica que contém as anormalidades celulares. Uma vez que este método retira apenas a porção afetada pelas células tumorais é possível manter (preservar) a função uterina (WWW.HEALTH.NYTIMES,2008). No caso das lesões intra-epiteliais, particularmente as de alto grau, a terapêutica adequada é usualmente a CNZ (ANDRADE, 2001). Esse tratamento também é freqüentemente usado para as neoplasias invasivas em estágios iniciais, reservando a radioterapia para os carcinomas inoperáveis ou para aquelas neoplasias em estágios iniciais, porém que apresentam um alto risco (JANICEK & AVERETTE, 2001). A conização também pode ser empregada como terapia definitiva para carcinomas micro-invasores, principalmente para aquelas pacientes que desejam manter a fertilidade. Porém, deve-se observar se não existem riscos adicionais à paciente, bem como se deve manter uma observação da paciente tratada, em intervalos freqüentes, para garantir que não exista uma neoplasia residual (MORRIS et al., 1993). O exame criterioso das margens de um produto de conização é de extrema importância quando se busca a presença de uma neoplasia residual (GURGEL et al., 1997). Uma recidiva das células tumorais se dá, em geral, nos

primeiros dois anos depois da conização. Em razão disso, é importante que sejam realizados exames preventivos em intervalos freqüentes ou até mesmo biopsias, quando necessário, na tentativa de garantir a perfeita recuperação da paciente e evitar a possibilidade do desenvolvimento de neoplasias invasivas (JANICEK & AVERETTE, 2001). Esse acompanhamento é importante por um longo período de tempo após a conização, devido a grande possibilidade de recorrência mesmo anos após a realização deste procedimento (MILOJKOVIC, 2002). O que se recomenda em termos de acompanhamento pós-tratamento são os exames clínico e colpocitológico a cada 3 ou 4 meses durante os primeiros 2 anos. Do 3º ao 5º ano as revisões podem ser expandidas para um tempo de 6 em 6 meses e a partir daí podem ser feitas revisões anuais (ANDRADE, 2001).

O tratamento com RTX é muito efetivo para o carcinoma cervical. Este tipo de terapia usa raios de alta energia (semelhante a raios X) para destruir as células cancerosas. Ele também é uma alternativa, juntamente com a cirurgia, para carcinomas cervicais em estágios iniciais. No caso de pacientes que estão muito enfermos para arriscar passarem por uma anestesia, a RTX pode evitar o tratamento cirúrgico (JANICEK & AVERETTE, 2001). A RTX tem o benefício de tratar toda a doença no campo de abrangência do raio, de maneira que os linfonodos também podem ser incluídos no tratamento. Outro uso da RTX é paliativo, significando que pacientes com casos muito avançados de câncer cervical são tratados com a intenção de minimizar sua dor bem como a sintomatologia, mais do que com o objetivo de curar sua doença (DOLINSKY, 2002).

A relação entre o carcinoma uterino e a produção de radicais livres tem ganhado grande importância na literatura científica tanto em relação ao potencial deletério destes radicais para as células, quanto pelo fato de que eles podem, dependendo do estágio da doença, gerar efeitos benéficos no sentido da destruição das células tumorais. Verifica-se também que o diagnóstico de tromboembolismo está freqüentemente associado ou precede o diagnóstico de uma doença maligna, sendo que os nucleotídeos de adenina podem influenciar a agregação plaquetária resultando numa ligação direta ou indireta com a trombose. Em vista disso, é importante a avaliação de evidências, já descritas na literatura bem como de novos achados, tanto

no que diz respeito à produção de radicais livres e sua ligação com doenças malignas como também da relação entre os nucleotídeos de adenina e suas enzimas de degradação com essas doenças, como será descrito a seguir.

3. ESTRESSE OXIDATIVO

3.1 Espécies reativas e defesas antioxidantes

Os radicais livres (RL) podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados (SLATER, 1984). As espécies reativas de oxigênio (EROs) bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidas normalmente em concentrações fisiológicas pelo metabolismo celular e, dependendo da sua concentração, podem promover tanto resultados favoráveis quanto desfavoráveis para a célula (VALKO et al., 2006).

O óxido nítrico (ON) apresenta um elétron desemparelhado sendo considerado, por isso, um radical. Ele é um radical abundante, que tem caráter oxidativo em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão, a regulação da pressão sangüínea e em mecanismos de defesa e regulação imune (VALKO et al., 2006). Uma vez produzido, o radical ON pode ser convertido em várias outras espécies reativas de nitrogênio: como o ânion nitroxil e o radical peroxinitrito, dependendo do meio envolvido (DRÖGE, 2002). Quando ocorre um aumento na geração destas espécies reativas de nitrogênio, de maneira que exceda a habilidade do sistema antioxidante em neutralizá-las, desenvolve-se uma condição denominada de estresse nitrossativo (VALKO et al., 2007).

Os radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies radicais geradas nos sistemas vivos. O ânion superóxido é a EROs primária e pode reagir com outras moléculas para gerar EROs secundárias (VALKO et al., 2007).

O radical hidroxil (OH^\cdot) tem uma alta reatividade, com uma meia vida bem curta de aproximadamente 10^{-9} s. Outra espécie reativa de oxigênio, gerada nos sistemas vivos, é o radical peroxil (ROO^\cdot). Os peroxissomos são conhecidos por produzir o

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sob condições fisiológicas, onde o consumo de oxigênio leva à produção de H_2O_2 , o qual participa da oxidação de uma variedade de moléculas (VALKO et al., 2007).

Os mecanismos de produção das EROs englobam tanto meios endógenos quanto exógenos. Fontes endógenas incluem a mitocôndria, o metabolismo do citocromo P450, os peroxissomos, a ativação celular inflamatória, bem como a produção por células como eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (CONNER & GRISHAM, 1996; VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). Fontes exógenas incluem carcinógenos e a exposição a xenobióticos como íons metálicos, a radiação e os barbituratos (VALKO et al., 2006).

Os RL desempenham várias funções fisiológicas, quando em concentrações baixas ou moderadas, incluindo a regulação do tônus vascular, a sensibilidade à tensão de oxigênio e a regulação das funções controladas pela concentração de oxigênio, o aumento da transdução de sinal e respostas ao estresse oxidativo que asseguram a manutenção da homeostase redox (DRÖDGE, 2002). A concentração destes radicais é mantida pelo balanço entre sua produção e sua depuração por antioxidantes (DRÖDGE, 2002). No momento em que há uma redução no nível deste sistema de defesa antioxidante e aumento dos níveis de substâncias oxidativas desenvolve-se o processo denominado de estresse oxidativo (DRÖDGE, 2002). O aumentado nível de oxidantes associado a alterações nos níveis de antioxidantes podem causar redução na resistência celular e conseqüente dano oxidativo às proteínas, aos lipídios e à molécula de DNA (MATÉS & SANCHEZ-JIMENEZ, 1999; MATES et al., 1999). O alvo primário do estresse oxidativo depende do tipo de célula, da natureza do estresse imposto, do sítio de geração, da proximidade das EROs de um alvo específico e da gravidade do estresse produzido (DALLE-DONNE et al., 2006).

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que retarde, previna ou remova o dano oxidativo à uma molécula (HALLIWELL, 2007). As defesas antioxidantes inerentes a uma célula incluem defesas enzimáticas e não-enzimáticas. As principais defesas enzimáticas de que uma célula dispõe incluem: a glutathiona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). As defesas não-enzimáticas são constituídas pelas vitaminas C e E, o β -caroteno e os antioxidantes

tiólicos como a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona oxidada (GSSG) (MATÉS et al., 1999; VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). Os antioxidantes atuam em duas principais linhas: uma atua antes do oxidante causar dano, atuando como detoxificante que são: a GSH, a CAT, a SOD e a GPx, e uma defesa que atua após o dano para reparação da lesão, a qual compreende o ácido ascórbico, a glutathiona redutase e a GPx (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Em pacientes com câncer, os antioxidantes podem desempenhar tanto efeitos benéficos quanto deletérios (promotores do crescimento do tumor). Esses efeitos deletérios estão intimamente relacionados à terapia anticâncer, uma vez que, os antioxidantes quando em excesso, podem reduzir a eficácia destes tratamentos. Por isso, antes da instituição de uma terapia com antioxidantes, em pacientes com câncer, vários fatores devem ser levados em consideração, principalmente no que diz respeito à concentração de EROs nesses pacientes (SALGANIK, 2001).

3.2 Glutathiona reduzida

A glutathiona reduzida, mais comumente denominada glutathiona ou GSH, é uma molécula pequena que está presente em praticamente todos os tecidos de mamíferos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; GUL et al., 2000; woodmed.com, 2002; ICIEK et al., 2004; VALKO et al., 2007). Ela é considerada a defesa antioxidante primária e o maior tampão redox intracelular, sendo um bom indicativo do estado redox da célula (VALKO et al., 2006). Sua molécula é um tripeptídeo formado a partir de três aminoácidos: o glutamato, a glicina e a cisteína (SIES, 1999; woodmed.com, 2002). O seu potencial antioxidante está intimamente ligado à presença de seu grupo sulfidril (SH), uma vez que este grupo tem um grande papel no caráter doador de elétrons da glutathiona (FERREIRA & MATSUBARA et al., 1997; woodmed.com, 2002). À medida que os elétrons são perdidos a molécula da GSH se torna oxidada (GSSG) (KIDD, 1997; GUL et al., 2000). Sua síntese envolve duas reações controladas enzimaticamente como segue: primeiramente há a combinação da cisteína com o glutamato, pela ação da

gama glutamil cisteinil sintetase e, posteriormente, a GSH sintetase combina a gama glutamil cisteína com a glicina para então gerar a GSH (SIES, 1999). A concentração de GSH é fortemente controlada, de maneira que as suas taxas de síntese, de reciclagem a partir da GSSG e de utilização são rigorosamente balanceadas (WWW.WOODMED.COM, 2002).

Dentre as funções celulares desempenhadas pela glutathiona podemos destacar:

1. Uma poderosa ação antiviral e anticancerígena;
2. É capaz de transformar as vitaminas E e C, oxidadas, a suas formas originais;
3. Tem um papel importante na síntese e também no reparo da molécula do DNA;
4. A glutathiona é usada pelo fígado na destoxificação de compostos tóxicos;
5. Desempenha um papel protetor frente às proteínas (KIDD, 1997; GUL et al., 2000; woodmed.com, 2002).

Os níveis de GSH em tecidos humanos variam de 0.1-10 mM, com as maiores concentrações encontrando-se em nível hepático. Várias condições de estresse oxidativo podem ser responsáveis por depletar os níveis de GSH, incluindo a radiação UV ou outros tipos de radiação, infecções virais, toxinas, processos cirúrgicos, a inflamação dentre outros (WWW.WOODMED.COM, 2002). Postula-se que a radiação ionizante poderia oxidar rapidamente os grupos tióis das células, de maneira que a radiação levaria a redução da concentração celular de GSH e ao aumento da GSSG. A sensibilidade de cada célula à radiação depende do nível intracelular de tióis (GUL et al., 2000). Estudos revelam essa relação da GSH com a resistência de certos tipos de tumores a drogas quimioterápicas bem como a resistência à terapia com radiação. JADHAV e colaboradores (1998), verificaram que a irradiação, em pacientes com carcinoma uterino do tipo escamoso, provocou uma queda nos níveis de GSH intra-tumoral e no sangue, sugerindo que a medida dos níveis de GSH, mesmo após a primeira fração de radiação, pode ter um papel preditivo na resposta do tumor ao tratamento e também ajudaria a identificar tumores radio-resistentes, uma vez que altos níveis de GSH têm um papel radioprotetor para a célula.

Da mesma forma, trabalhos relatam as alterações na GSH na presença de diferentes tipos de carcinomas (KUMARAGURUPARAN et al., 2002; MANJU et al.,

2002; KUMARAGURUPARAN et al., 2005). Um fato muito relevante é que concentrações normais de GSH e outros antioxidantes no meio intracelular protegem o DNA das EROs e reduzem a prevalência de câncer. Por outro lado, concentrações normais destes mesmos antioxidantes no câncer já instalado, favorecem a proliferação celular maligna, reduzem a apoptose e facilitam a neoangiogênese tumoral (JÚNIOR, 2004).

3.3 Catalase:

A catalase é uma enzima tetramérica constituída de 4 subunidades de 60 KDa, sendo que cada uma delas é composta por 1 grupamento ferro-protoporfirina (MATÉS & SANCHEZ-JIMÉNEZ et al., 1999; MATES et al., 1999). A catalase é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio em altas concentrações, conduzindo a formação de água e oxigênio (CHAUDIÉRE & FERRARI-ILIOU, 1999; MATÉS & SANCHEZ-JIMÉNEZ et al., 1999; MATES et al., 1999).



Esta enzima está presente nas células de plantas, animais e bactérias aeróbicas. Encontra-se localizada em uma organela celular denominada peroxissomo. Quando os peroxissomos são danificados, podem causar alterações nas suas atividades enzimáticas, liberando o peróxido de hidrogênio no citosol o qual pode contribuir para o estresse oxidativo (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007).

Várias são as evidências da relação entre as defesas antioxidantes e as doenças malignas, inclusive as do trato ginecológico (CASADO et al., 1995; MANJU et al., 2002; KIM et al., 2004; MANOHARAM et al., 2004; BEEVI et al, 2007). MANOHARAM e colaboradores (2004), bem como MANJU e colaboradores (2002), verificaram um decréscimo nos níveis das enzimas antioxidantes, incluindo a catalase, na circulação de pacientes com carcinoma cervical uterino. Segundo MANJU e colaboradores (2002), esse decréscimo pode ser em decorrência do seqüestro das enzimas pela própria célula tumoral ou pelo fato das enzimas estarem atuando na defesa contra os radicais

livres o que poderia diminuir sua atividade. Segundo MANOHARAM e colaboradores (2004) a redução na atividade da enzima catalase poderia servir como um marcador de transformação neoplásica tumoral. KIM e colaboradores (2004) compararam alguns indicadores de dano oxidativo e das defesas antioxidantes em pacientes com NIC e outras com carcinoma cervical invasivo, observando que os níveis de alguns antioxidantes estavam reduzidos tanto nas pacientes com NIC quanto nas com carcinoma, porém não houve diferença entre esses dois diferentes estágios de desenvolvimento da doença, sugerindo que o distúrbio no sistema antioxidante ocorre no estágio inicial da transformação neoplásica tumoral.

3.4 Oxidação protéica

As proteínas são consideradas o maior alvo para o dano oxidativo, uma vez que estas são as maiores componentes dos sistemas biológicos e podem neutralizar 50-75% dos radicais reativos. A oxidação das proteínas é uma modificação covalente induzida tanto diretamente pelas EROs quanto indiretamente por reação com produtos secundários do estresse oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2006). A maioria dos estudos não diferencia quais grupamentos carbonil são produzidos de maneira direta e quais são gerados via reação secundária, fazendo com que esses grupamentos sejam considerados marcadores abrangentes de oxidação de proteínas (SHACTER, 2000).

Os grupos carbonil (CO) (aldeídos ou cetonas) são produzidos através de diferentes mecanismos. As EROS podem reagir diretamente com as proteínas ou com moléculas como açúcares e lipídios, gerando compostos carbonílicos altamente reativos que então reagem com as proteínas. Esses derivados carbonílicos altamente reativos são resultantes tanto da oxidação das cadeias laterais de arginina, lisina, treonina e prolina ou ainda pela clivagem das ligações peptídicas. Os grupos carbonil também podem ser introduzidos nas proteínas através da decomposição oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, gerando aldeídos os quais reagem diretamente com os resíduos de lisina, histidina e cisteína e, por fim, os grupos carbonil ainda podem ser introduzidos nas proteínas através da reação do grupo amino primário da lisina com derivados

carbonil reativos produzidos pela reação dos açúcares redutores ou seus produtos de oxidação, com os resíduos de lisina das proteínas (HENSLEY et al., 2000; SHACTER, 2000; DALLE-DONNE et al., 2003; DALLE-DONNE et al., 2006).

O conteúdo de proteína carbonil (PCO) é um bom biomarcador de dano oxidativo grave das proteínas (DALLE-DONNE et al., 2003; DALLE-DONNE et al., 2003). Uma vez formados, os grupos carbonil são quimicamente estáveis, o que facilita tanto o seu armazenamento quanto a sua detecção (DALLE-DONNE et al., 2003; DALLE-DONNE et al., 2003). Agentes que podem levar ao dano oxidativo protéico incluem o peróxido de hidrogênio, os xenobióticos como o paraquat, o tabagismo, a irradiação gama, a luz UV bem como os neutrófilos ativados (SHACTER, 2000).

Visto que as proteínas desempenham diversas funções biológicas o dano a essas estruturas pode levar a muitas consequências, podendo produzir (ou não) um efeito específico na atividade biológica destas moléculas (DALLE-DONNE et al., 2006). Dentre esses efeitos destacam-se: o dano a enzimas, o qual incorre em modificações severas do metabolismo e o dano a proteínas estruturais como, por exemplo, o fibrinogênio o que leva ao decréscimo da inibição da coagulação (SHACTER, 2000). De uma maneira geral, a carbonilação de proteínas pode vir a alterar a conformação da cadeia polipeptídica, o que poderá levar a inativação parcial ou total da função da proteína (DALLE-DONNE et al., 2006).

3.5 Lipoperoxidação

Da mesma forma que as proteínas e o DNA, os lipídios presentes na membrana celular também são alvo para o dano oxidativo, gerando profundas alterações tanto na organização estrutural quanto nas funções da membrana celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; MANOHARAM et al., 2004).

Quando um radical livre é produzido em excesso, ele pode reagir com ácidos graxos poliinsaturados, presentes na membrana, processo este denominado de lipoperoxidação (SLATER, 1984; VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). Esse processo freqüentemente causa danos à estrutura da membrana, podendo resultar em

modificações na permeabilidade da mesma, fazendo com que ocorra a entrada ou saída de moléculas importantes devido à perda da seletividade desta membrana (SLATER, 1984; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007).

O processo de lipoperoxidação gera produtos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), porém o MDA é um produto bastante mutagênico em bactérias e células de mamíferos e um agente carcinogênico em ratos (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). Além disso, o MDA tem um papel fundamental na patogênese de várias doenças e processos antiinflamatórios (SOVIC et al., 2001; ZHANG et al., 2002).

A literatura evidencia a relação entre os níveis de MDA, ou da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o carcinoma uterino sendo que a grande maioria dos achados relata um aumento nos níveis de TBARS (ou de MDA) na circulação destes pacientes (MANJU et al., 2002; KIM et al., 2004; MANOHARAM et al., 2004; MILA-KIERZENKOWSKA et al., 2004; BEEVI et al., 2007).

MANOHARAM e colaboradores (2004) demonstraram um aumento nos níveis de TBARS em eritrócitos de pacientes com carcinoma cervical uterino. BEEVI e colaboradores (2007) também verificaram um aumento nos níveis de MDA plasmáticos e eritrocitários em pacientes com carcinoma cervical uterino do tipo escamoso. Ambos sugerem que a própria célula tumoral pode gerar EROs os quais podem danificar lipídeos. MANOHARAM (2004) sugere ainda, que o aumento pode ser em decorrência da redução nos níveis de defesas antioxidantes. Outros trabalhos também evidenciam um aumento nos níveis de TBARS no plasma de pacientes com câncer cervical e NIC, aumento esse que pode ser atribuído ao decréscimo nas defesas antioxidantes (MANJU et al., 2002; KIM et al., 2004). Em pacientes com carcinoma cervical tratadas com braquiterapia, verificou-se um aumento nos níveis de TBARS, plasmáticos e eritrocitários, durante o tratamento, pela deficiência do sistema antioxidante, bem como pela aumentada geração de produtos de peroxidação lipídica no próprio tumor e sua conseqüente liberação na circulação (MILA-KIERZENKOWSKA et al., 2004). Estes achados demonstraram a importância da avaliação da lipoperoxidação relacionada ao câncer, não apenas como mais um achado da doença maligna, mas possivelmente

como uma ferramenta para, futuramente, trabalhar no intuito de minimizar ou prevenir o dano celular provocado por essas moléculas.

3.6 Estresse oxidativo e câncer

Uma vez que as EROs estão envolvidas no dano oxidativo à biomoléculas, as mesmas podem ser responsáveis por converter células normais em células malignas, sendo consideradas potentes carcinógenos (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). Estima-se que por dia uma célula esteja exposta a $1,5 \times 10^5$ processos de oxidação ocasionados tanto por radicais hidroxil quanto por outras moléculas reativas. O radical hidroxil pode ocasionar danos permanentes a qualquer um dos tipos de bases do DNA, tanto as púricas quanto as pirimídicas, dano esse que é considerado o primeiro passo para a ocorrência de processos como a mutagênese e a carcinogênese (BECKMAN & AMES, 1997). Em virtude da ocorrência destes dois fenômenos, ao final, pode ocorrer a morte celular, principalmente se a capacidade do sistema antioxidante estiver comprometida (ZIEBA et al., 2000). Devido ao fato de que as EROs são oxidantes por natureza, elas influenciam o “status” redox e podem, de acordo com sua concentração, causar tanto uma resposta positiva (proliferação celular) quanto negativa (impedimento do crescimento ou morte celular) (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007).

São inúmeros os trabalhos que abordam a relação entre o estresse oxidativo e as doenças malignas, em particular o carcinoma cervical uterino. Esse tema adquire relevância clínica pelo fato de que as EROs estão envolvidas em etapas da carcinogênese, e a presença de um meio intracelular redutor provoca a proliferação celular, enquanto que um meio oxidante poderia destruir as células tumorais (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007).

É fato que, em grande parte dos trabalhos, o estado redox cursa com um aumento dos níveis de moléculas oxidantes acompanhado da redução nas defesas antioxidantes (MANJU et al., 2002; MANOHARAM et al., 2004; KIM et al., 2004; MILAKIERZENKOWSKA et al., 2004; BEEVI et al., 2007). Muitos autores concordam que esse aumento no nível de oxidantes se deve a própria célula tumoral, pelo fato destas

células gerarem radicais livres, em resposta ao excessivo dano celular, e os lançarem na circulação (MILA-KIERZENKOWSKA et al., 2004; BEEVI et al., 2007). Já outros autores, sugerem que este aumento resulta, em parte, de uma possível deficiência no sistema de defesa antioxidante, resultado dele estar envolvido no combate ao nível aumentado de oxidantes (MANJU et al., 2002; KIM et al., 2004).

A radiação ionizante também é responsável por muitos danos oxidativos, tais como: a síntese de antígenos específicos e o dano ao DNA. Esses danos oxidativos podem ocorrer tanto via fatores diretos quanto indiretos. Os efeitos diretos são devido ao depósito de energia ao longo do raio, o que leva a reações complexas como reações de ionização. Os efeitos indiretos são causados pela produção de EROs, as quais podem subsequente danificar moléculas fundamentais (RILEY, 1994).

A maioria das publicações trata do perfil oxidativo (nível de oxidantes e antioxidantes) na circulação de pacientes com doenças malignas, uma vez que a determinação do perfil redox intra-tumoral se torna dificultada pela complexidade da célula tumoral em relação à célula normal. Isso se deve a fatores como os diferentes estados de crescimento da célula tumoral, a heterogeneidade da composição desta célula, e também porque tumores sólidos apresentam infiltrados de células do hospedeiro como fibroblastos e leucócitos o que também dificulta a medição do estado redox (COOK et al., 2004).

É crescente a importância da avaliação do “status” oxidativo na rotina de pacientes oncológicos. Muitos profissionais da área médica instituem a terapia antioxidante para minimizar os efeitos de determinados tratamentos, porém é importante que se ressalte que, se não houver a adequada avaliação desses pacientes, a instituição deste tipo de terapia pode, muitas vezes, trazer mais malefícios do que benefícios e até mesmo invalidar a terapia adotada (JÚNIOR, 2004).

4. NUCLEOSÍDEOS E NUCLEOTÍDEOS

Os nucleosídeos são moléculas resultantes da união de uma base púrica ou pirimídica a uma pentose. Exemplos destas moléculas incluem: a citidina, a uridina, a guanosina, a timidina, a inosina e a adenosina. Uma vez que os nucleosídeos são fosforilados por quinases específicas ocorre a formação de um nucleotídeo. Os nucleotídeos desempenham funções importantes tanto no transporte quanto na transformação de energia celular. Os principais nucleotídeos que exercem funções biológicas são: a adenosina trifosfato (ATP), a adenosina difosfato (ADP) e a adenosina monofosfato (AMP) (ATKINSON et al., 2006).

Os nucleotídeos são liberados no meio extracelular através de mecanismos como, por exemplo, a lise celular que ocorre frente à injúria celular. Também podem ser liberados por vesículas tais como os grânulos densos das plaquetas, que liberam o ATP e o ADP. A molécula de adenosina também pode ser liberada no meio extracelular como resultado da degradação do ATP e do ADP por enzimas específicas (HUNSUCKER et al., 2005; YEGUTKIN, 2008).

A sinalização purinérgica envolve três principais componentes: 1) os nucleotídeos de adenina, 2) os receptores através dos quais eles exercem seus efeitos e 3) as ectoenzimas, responsáveis pelo controle dos níveis destas moléculas no meio extracelular (ATKINSON et al., 2006). As moléculas de nucleotídeos regulam uma multiplicidade de funções teciduais que incluem o fluxo sanguíneo, a secreção, a inflamação e as reações imunes (LUTHJE, 1989; BURNSTOCK & KNIGHT, 2004). O ATP é um nucleotídeo presente em praticamente todas as células vivas e tem um papel fundamental no metabolismo energético (AGTERESCH et al., 1999). Juntamente com o ADP, o ATP também é liberado dos grânulos plaquetários no momento em que estas células sofrem o processo de ativação. O ATP tem um duplo efeito sobre a agregação das plaquetas: em baixas concentrações ele induz a agregação plaquetária, enquanto que em altas concentrações ele provoca a inibição deste fenômeno (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997). O ADP é reconhecidamente um agente indutor da agregação de plaquetas. Quando ocorre um evento que desencadeie a agregação

plaquetária este nucleotídeo é liberado destas células e recruta novas plaquetas vindas da circulação de forma a amplificar o sinal agregatório (BAKKER et al., 1994).

Cada nucleotídeo, uma vez presente no meio extracelular, desempenha sua ação pela ligação a um tipo diferente de receptor. Sabe-se que cada célula responsável por liberar esses nucleotídeos possui receptores para tais moléculas do tipo P2X e P2Y (ROBSON et al., 2006). Os receptores P2Y são ativados pelo ATP, apresentando 7 regiões transmembrana, com a porção aminoterminal voltada para o meio extracelular e a porção carboxiterminal voltada para o meio citoplasmático. Os receptores P2X são acoplados a canais iônicos ligados ao ATP, atuando via cátions mono e divalentes, sendo que seus domínios amino e carboxiterminal estão voltados para o lado citoplasmático. A transdução de sinal se dá pelo influxo de sódio e cálcio e efluxo de potássio com despolarização da membrana e aumento do cálcio intracelular (DI VIRGILLIO et al., 2001; ROBSON et al., 2006; BURNSTOCK, 2007).

Uma vez exercidos seus efeitos, as moléculas de nucleotídeos devem ser degradadas de modo a manter seus níveis em concentrações fisiológicas. Para isso existe uma ampla classe de proteínas catalíticas (ectonucleotidases) ancoradas à membrana as quais contém seu sítio ativo voltado para o meio extracelular e efetuam a degradação destes nucleotídeos (GODING & HOWARD, 1998; ZIMMERMANN, 2001). As NTPDases atuam convertendo o ATP em ADP e subseqüentemente convertem o ADP em AMP. Por fim, a enzima 5'-nucleotidase converte o AMP formado em adenosina. A molécula de adenosina produzida desempenha vários papéis, dentre os quais destacam-se os efeitos neuromodulatórios, a inibição da agregação plaquetária, a vasodilatação, a regulação de processos inflamatórios e também desempenha papéis importantes frente a uma doença maligna (BAKKER et al., 1994; SPYCHALA, 2000; MERIGHI et al., 2003; BOROWIEC et al., 2006). O desenvolvimento do câncer é acompanhado de um escasso suprimento sangüíneo pela pequena quantidade de vasos e ainda pelo fato de que seu calibre não tem tamanho suficiente para garantir o bom fluxo de sangue. Em conseqüência disso, há um reduzido suprimento de oxigênio e subseqüente degradação de nucleotídeos, o que leva a formação de adenosina (SPYCHALA, 2000). A adenosina tem conhecidas propriedades promotoras de tumor, dentre as quais destacam-se: as funções promotoras do crescimento, o estímulo da

angiogênese e da vasculogênese além de funções citoprotetoras (SPYCHALA, 2000; HASKÓ & CRONSTEIN, 2004).

Foram descritos 4 receptores para a adenosina: A1, A2A, A2B e A3, todos os receptores são glicoproteínas transmembrana acopladas à proteína G. Esses receptores têm diferentes envolvimento na tumorigênese. O papel dos receptores A1 no desenvolvimento do tumor é desconhecido. Os receptores A2A contribuem para o papel imunossupressor e anti-isquêmico da adenosina. Já os receptores A2B, promovem a proliferação das células endoteliais e, desta maneira, contribuem para o crescimento e expansão do tumor, pela indução da neovascularização em áreas ao redor do tumor (MERIGHI et al., 2003). Os receptores A3 têm um papel importante na morte celular. Acredita-se que sua expressão seja reduzida em tecidos normais e alta em presença de células tumorais, por isso se cogita o fato de os receptores A3 serem bons marcadores de células tumorais (MERIGHI et al., 2003).

Ainda, seguindo a seqüência de degradação dos nucleotídeos, existe a enzima adenosina deaminase (ADA), a qual degrada a adenosina levando a formação de inosina (ZIMMERMANN, 2000; BOURS et al., 2006).

5. A FAMÍLIA DAS ECTOENZIMAS

Os nucleotídeos de adenina são comprovadamente moléculas importantes no desempenho de várias funções orgânicas. Sua presença na circulação pode desencadear uma ampla variedade de ações dependendo de suas concentrações e de sua ligação a receptores específicos. Em razão disto, também é de grande importância que exista um sistema responsável pelo controle dos seus níveis extracelulares. O controle das ações dos nucleotídeos de purina e pirimidina se dá por uma variedade de enzimas ancoradas na membrana plasmática das células ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel. Membros desta classe de ectoenzimas incluem: as NTPDases (Nucleotídeo Trifosfato Difosfoidrolase), a família das NPPs (Nucleotídeo Pirofosfatases/Fosfodiesterases), as fosfatases alcalinas e a 5'-nucleotidase

(ZIMMERMANN, 2001). Além das enzimas citadas, existe a enzima ADA, a qual é também uma importante enzima da cadeia inativadora de purinas, responsável pela hidrólise da adenosina formando inosina. Ela apresenta uma localização citosólica, mas pode também estar localizada na superfície da membrana celular, como uma ectoenzima, como será exposto a seguir (YEGUTKIN, 2008).

Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da NTPDase e da NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP formando AMP. A seguir a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina, que por fim é degradada pela ADA gerando inosina (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001). A fosfatase alcalina além de hidrolisar nucleotídeos di, tri e monofosfatados também é responsável pela liberação de fosfato inorgânico de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo proteínas, além de hidrolisar PPI (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008).

5.1 NTPDase e 5'-nucleotidase:

O relato de que as células apresentam a capacidade de hidrolisar nucleotídeos como o ADP já é reconhecido há muitos anos, porém a identificação molecular da NTPDase-1 não foi feita até a metade de 1990. A primeira identificação da estrutura molecular foi feita quando a NTPDase de batata foi clonada (HANDA & GUIDOTTI, 1996) e demonstrou propriedades similares aquelas da enzima da membrana plasmática (BOURS et al., 2006).

As NTPDases representam uma classe de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos di e tri fosfatados à seus monofosfonucleotídeos correspondentes. Essa classe de enzimas inclui 8 membros (NTPDases 1-8) os quais são diferenciáveis através da preferência por um ou outro substrato, pela presença de cátions divalentes e também pelo tipo de produto formado (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). Quatro destas enzimas são tipicamente localizadas na superfície celular, ancoradas a membrana via dois domínios transmembrana, tendo seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (NTPDases 1, 2, 3 e 8). A NTPDase-1 foi primariamente identificada

como um antígeno de ativação (CD39). Subseqüentemente, foi purificada e clonada a NTPDase de tubérculos de batata e de diferentes tecidos de mamíferos (HANDA & GUIDOTTI, 1996). A atividade da NTPDase-1 foi demonstrada também no endotélio vascular, em células da musculatura lisa, no pâncreas, nas células dendríticas bem como em células sanguíneas como linfócitos, plaquetas de humanos e ratos, eritrócitos e plasma (FRASSETO et al., 1993; SARKIS et al., 1995; PILLA et al., 1996; ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008). Já a NTPDase-2, é particularmente associada com o sistema nervoso central e periférico e a enzima presente no sistema vascular pode regular ou inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP ou ATP (YEGUTKIN, 2008). A NTPDase-3 está associada com estruturas neuronais, onde ela pode atuar regulando os níveis de ATP nos locais pré-sinápticos e coordenar a homeostase de processos como a fome e o sono. As NTPDases 5 e 6 têm uma localização intracelular e podem ser clivadas formando uma proteína solúvel. As NTPDases 4 e 7 estão localizadas completamente no meio intracelular com face para o lúmen de organelas citoplasmáticas (ZIMMERMANN, 2001). A última NTPDase a ser caracterizada, a NTPDase-8, mostrou uma grande expressão no fígado com níveis menores da enzima detectados nos rins e jejuno. A enzima também demonstrou envolvimento na regulação da secreção da bile (YEGUTKIN, 2008).

Todos os membros da família das NTPDases apresentam 5 regiões denominadas regiões conservadas da apirase (ACRs), o que torna essa característica uma “marca” desse conjunto de enzimas. Essas ACRs são de muita relevância para sua atividade catalítica. Existem evidências sugerindo que as diferenças na preferência pelo substrato, nessa família de enzimas, pode ser atribuída a pequenas diferenças na estrutura protéica que afetaria a ligação do substrato (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006).

A NTPDase-1 (E.C 3.6.1.5, CD39) hidrolisa os nucleotídeos ATP e ADP igualmente bem, em mamíferos. Esta enzima é encontrada, entre outros locais, em células como os linfócitos, as plaquetas e as células endoteliais, tendo um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo e da trombogênese (PILLA et al., 1996; ZIMMERMANN, 2001; LEAL et al., 2005).

Quando se aborda o tema “sistema vascular”, a NTPDase-1/CD39 desempenha um papel importante no sistema hemostático, uma vez que ela controla os efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios de nucleotídeos como o ATP e o ADP (YEGUTKIN, 2008). A NTPDase-1, presente nas células endoteliais e membrana de plaquetas, converte o ATP em ADP e subseqüentemente o ADP, um nucleotídeo promotor da agregação, em AMP. A enzima 5'-nucleotidase converte o AMP formado em adenosina. A adenosina, por sua vez, tem propriedades vasodilatadoras e, portanto, anti-agregantes (BAKKER et al., 1994; ZIMMERMANN, 2001). Com isso, a NTPDase-1 em combinação com a 5'-nucleotidase tem um papel crucial na desfosforilação seqüencial destes nucleotídeos e conseqüentemente na proteção contra a ativação descontrolada de plaquetas.

As plaquetas são células discóides, anucleadas responsáveis pelo controle da hemostasia primária. O mecanismo de hemostasia primária ocorre quando a continuidade de um vaso sanguíneo é interrompida, e uma série de reações é desencadeada. Os eventos iniciais são modulados pelos componentes expostos dos vasos sanguíneos, como as microfibrilas, a membrana basal e o colágeno. Concomitantemente, ocorrem: a adesão plaquetária à matriz subendotelial e a ativação plaquetária (LORENZI, 1999; MARCUS et al., 2003).

As plaquetas contêm 2 tipos de grânulos com substâncias vasoativas, sendo eles: os grânulos alfa contendo várias proteínas adesivas, e os grânulos densos contendo nucleotídeos, como ADP e o ATP, a serotonina, o Ca^{2+} , substâncias que promovem ativação plaquetária (BAKKER et al., 1994). Sabe-se que o ATP também liberado das plaquetas, eritrócitos rompidos e outras células, é um indutor de choque (PILLA et al., 1996).

A enzima 5'-nucleotidase (E.C 3.1.3.5, CD73) é uma glicoproteína ancorada à membrana via GPI, sendo responsável pela hidrólise de nucleotídeos monofosfato formando adenosina (ZIMMERMANN, 2001; COLGAN et al., 2006). Sete membros já foram caracterizados apresentando diferentes localizações: 5 estão localizadas no citosol, 1 na matriz mitocondrial e 1 ancorada na membrana plasmática. Elas diferem entre si por suas propriedades moleculares e cinéticas bem como pela especificidade com o substrato. Sabe-se que a adenosina, o produto da ação catalítica da enzima 5'-

nucleotidase, exerce diversos efeitos em vários tecidos os quais são consequência de sua ligação aos diferentes tipos de receptores encontrados nestes locais (BOROWIEC et al., 2006).

Tanto no caso da NTPDase quanto da 5'-nucleotidase foram descritos os perfis destas enzimas em associação à doenças humanas importantes (LUNKES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005; LEAL et al., 2005; LEAL et al., 2007). Em pacientes com carcinoma de mama, tanto a atividade da NTPDase quanto da 5'-nucleotidase encontraram-se alteradas na presença do tumor e também em função do uso de tamoxifeno (ARAÚJO et al., 2005). Em pacientes com diabetes do tipo 2, em pacientes hipertensos e pacientes diabéticos/hipertensos, observou-se um aumento nas hidrólises do ATP e do ADP em relação ao grupo saudável, possivelmente funcionando como um mecanismo compensatório para evitar a formação de processos tromboembólicos na circulação, uma vez que o ADP estaria sendo degradado e, ao final da cadeia enzimática, estaria sendo formada a adenosina que tem propriedades vasodilatadoras, anti-agregantes e anti-inflamatórias (LUNKES et al., 2003).

Em gestantes as atividades tanto da NTPDase quanto da 5'-nucleotidase revelaram alterações variáveis conforme a presença de fatores de risco associados a gestação tais como: a hipertensão e o diabetes. Nesses casos as hidrólises do ATP, do ADP e do AMP encontraram-se aumentadas de maneira independente dos fatores de risco associados, mostrando novamente o envolvimento destas enzimas no processo trombogênico e de fato elas poderiam manter a homeostasia uma vez que estão envolvidas no processo de anticoagulação (LEAL et al., 2007).

5.2 Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP)

A família das NPPs (nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase) inclui 7 membros (NPP1-7) envolvidos numa grande variedade de atividades biológicas, que incluem: a formação dos ossos, a motilidade celular, as metástases tumorais e a resistência à insulina em diabetes do tipo II (GODING et al., 2003; STEFAN et al., 2006). As NPPs1-3 estão envolvidas na hidrólise de nucleotídeos e as NPPs 6-7 hidrolisam ligações

fosfodiéster em fosfolipídeos e fosfoésteres de colina. Notavelmente a NPP-2 hidrolisa tanto fosfolipídeos quanto nucleotídeos (STEFAN et al., 2006). Relata-se também a existência das NPPs 4 e 5, porém pouco se sabe sobre sua atividade catalítica (GODING et al., 2003). Exceto a NPP2, todas as demais NPPs têm um único domínio transmembrana. As NPPs 1 e 3 têm uma orientação transmembrana do tipo II, com sua porção amino-terminal voltada para o meio intracelular, enquanto que as NPPs 4-7 têm um orientação do tipo I, com sua porção amino-terminal voltada para o meio extracelular. A NPP2 só existe como uma proteína solúvel (STEFAN et al., 2005; STEFAN et al., 2006). Todas as NPPs têm, voltado para o meio extracelular, um domínio catalítico com 60% de identidade de aminoácidos entre as diferentes isoformas da enzima (STEFAN et al., 2005; STEFAN et al., 2006). Esse domínio catalítico é fixado à membrana por uma “haste” que consiste de porções ricas em cisteína (GODING, 2000). Devido ao fato de seu sítio catalítico ser voltado para o meio extracelular essa família de enzimas é denominada ecto-NPPs (E-NPPs) e funcionam, *in vitro*, em pH alcalino entre 8.5-8.9 (GODING, 2000). A porção extracelular contém ainda um resíduo de treonina que é transitoriamente adenilado e/ou fosforilado durante o mecanismo catalítico.

Verificou-se também que a E-NPP e a enzima fosfatase alcalina apresentam algumas semelhanças estruturais. Ambas contém 2 íons metálicos no sítio ativo, 6 ligantes metálicos e na E-NPP um resíduo de treonina está posicionado de maneira análoga ao resíduo de serina da fosfatase alcalina. A diferença entre a preferência por substratos das duas enzimas E-NPP (preferência por diésteres) e a fosfatase alcalina (preferência por monoésteres), surge em razão de diferenças na composição de seus sítios ativos (ZALATAN et al., 2006). Dentre os achados que explicam as diferenças entre a preferência por um ou outro substrato, a presença de um ligante (grupo funcional adicional) ligado ao grupo fosforil que é transferido nas reações diéster poderia levar a preferência por diésteres. Também a presença de cargas negativas no grupo fosforil. No caso das fosfatases alcalinas, as reações por elas catalisadas dependem da quantidade de cargas negativas no átomo de O₂ situado entre duas moléculas de zinco. São relevantes também as propriedades eletrostáticas dos sítios ativos bimetálicos (ZALATAN et al., 2006).

As ecto-fosfodiesterases têm uma ampla especificidade, sendo responsáveis pela hidrólise de ligações pirofosfato e fosfodiéster de nucleotídeos e seus derivados, resultando na produção de nucleotídeos monofosfato. Funcionam como substrato para esta enzima nucleotídeos 5'-trifosfato como o ATP gerando AMP e P_{PPi}, também nucleotídeos 5'-difosfato como o ADP gerando AMP e Pi, bem como nucleotídeos de açúcar, 3'-5' AMP gerando também AMP e ainda hidrolisam a 5'-timidina monofosfato (ZIMMERMANN, 2000; BOLLEN et al., 2000; GODING, 2000; STEFAN et al., 2005; STEFAN et al., 2006; YEGUTKIN, 2008). Embora esta família de enzimas esteja sempre envolvida na hidrólise de nucleotídeos de adenina, elas também podem hidrolisar GTP, TTP, CTP e UTP com similar eficiência (VOLLMAYER et al., 2003).

A E-NPP foi caracterizada em plaquetas de ratos e apresentou atividade catalítica adaptada para o meio extracelular (FÜRSTENAU et al., 2006). A reação enzimática ocorre em 2 passos: no primeiro passo os resíduos de serina e treonina do sítio catalítico formam um intermediário com o grupo fosfato do substrato e no segundo passo uma molécula de água é usada para regenerar o sítio ativo (serina/treonina) e liberar o produto fosforilado. O pH ideal fica entre 8.5-9 visto que a hidrólise do intermediário nucleotilado se dá neste pH (STEFAN et al., 2006; FÜRSTENAU et al., 2006).

Em vista de esta enzima ter sido caracterizada na membrana plaquetária e, devido ao fato de apresentar propriedades catalíticas semelhantes à E-NTPDase, pressupõem-se que haja uma co-expressão da E-NTPDase, da E-NPP e da 5'-nucleotidase nesta célula. Com isso, pode-se dizer que elas constituem uma cadeia enzimática responsável pela hidrólise extracelular de nucleotídeos (FÜRSTENAU et al., 2006).

As E-NPPs desempenham vários papéis fisiológicos dentre os quais destacam-se a reciclagem de nucleotídeos, a regulação dos níveis extracelulares de pirofosfato e o estímulo da motilidade celular. Várias situações demonstraram o envolvimento das E-NPPs tais como: na disfunção da mineralização óssea, na motilidade e migração celular, na angiogênese, na invasão de células tumorais e no diabetes tipo 2 (GODING et al., 2003).

5.3 Adenosina deaminase

A adenosina presente no meio extracelular provém do metabolismo do AMP pela ação catalítica da enzima 5'-nucleotidase ou também pela liberação através de células. Uma vez que ela desempenha inúmeras funções nos sistemas vivos, sua concentração deve ser precisamente regulada (SPYCHALA, 2000).

A enzima adenosina deaminase (ADA) (E.C 3.5.4.4) também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação seqüencial dos nucleotídeos e nucleosídeos na circulação. A ADA é responsável pela deaminação da adenosina com a conseqüente produção de inosina regulando, com isso, as concentrações pericelulares e locais deste nucleosídeo (RESTA et al., 1998; ROBSON et al., 2006).

A ADA, em humanos, existe em pelo menos três formas moleculares: ADA1, a qual é um monômero com massa de aproximadamente 35 KDa, a ADA1 + CP, com massa molecular de aproximadamente 28 KDa a qual é formada por duas moléculas de ADA1 combinadas por uma proteína de ligação (CP) e a ADA2 codificada por um gene separado de posição ainda desconhecida (HIRSCHHORN & RATECH, 1980; UNGERER et al., 1992).

Existem evidências de que a ADA pode aparecer na superfície celular (FRANCO et al., 1997). Esta enzima seria responsável pela hidrólise da adenosina no meio extracelular. Sabe-se que a ecto-ADA é responsável por grande parte do desaparecimento da adenosina circulante nesse meio. Aparentemente não existem diferenças, tanto catalíticas quanto moleculares, entre a enzima presente no citosol e a ecto-ADA. Esta evidência deve-se ao fato de que apenas 1 gene para a ADA foi encontrado, demonstrando que as seqüências protéicas das duas enzimas são idênticas (FRANCO et al., 1997).

Relatos sugerem que existem pelo menos duas proteínas responsáveis pelo ancoramento da ecto-ADA na membrana celular. A primeira delas a ser identificada foi a CD26, que é uma sialoglicoproteína de membrana do tipo II que compreende 2 subunidades de aproximadamente 100 KDa cada. A proteína humana é predominantemente extracelular e constituída de uma região transmembrana

hidrofóbica de 22 aminoácidos e uma “cauda” citoplasmática de 6 aminoácidos. A segunda proteína responsável pelo ancoramento da ecto-ADA à membrana é o receptor de adenosina A1 (A1R) (FRANCO et al., 1997).

A atividade da ADA é bastante variável na presença de diferentes doenças malignas. YILDIRIM e colaboradores (1999) avaliaram a atividade da ADA em pacientes com diferentes tipos de câncer de pulmão e não encontraram nenhuma alteração significativa nos níveis desta enzima nesse grupo de pacientes.

Em 2005, AGHAEI e colaboradores demonstraram um aumento da ADA total e da ADA2 no soro de pacientes com câncer de mama, aumento esse, correlacionado com a menopausa e pós-menopausa. Possivelmente esse aumento se deva a ocorrência de enzimas vindas de outras fontes que não o tumor. Estes autores também encontraram um aumento em ambas as enzimas no tecido tumoral, correlacionando esse aumento com o grau do tumor, o tamanho e o envolvimento de linfonodos, o que pode funcionar como índice de proliferação do tumor de mama. Sendo assim, a reduzida atividade da ADA estaria relacionada com o melhor prognóstico para esta doença.

Como existem diferentes isoformas da enzima em células normais e malignas mesmo se não forem verificadas alterações na atividade da enzima total, isso não indica que as suas isoformas não possam estar alteradas (SPYCHALA, 2000). Outra possibilidade para aumentada atividade da ADA, em virtude da proliferação tumoral, é de que ela poderia estar oferecendo vantagens para o crescimento das células tumorais (MOSS & HANDERSON, 1996).

A atividade sérica da ADA encontra-se aumentada em outras doenças, que não somente o câncer, tais como: as doenças hepáticas, a tuberculose, a mononucleose infecciosa, a pneumonia e a artrite reumatóide. Em todas essas doenças, a aumentada atividade da ADA se deve principalmente a isoenzima ADA2, refletindo o envolvimento do sistema imune (KOEHLER & BENZ, 1962; UNGERER et al., 1992).

6. TROMBOSE E CÂNCER

Em 1865, Trousseau identificou a relação existente entre a trombose e as doenças malignas. Tanto a trombose arterial quanto a venosa são complicações freqüentes do câncer. Os mecanismos envolvidos nessa associação quase sempre são resultado da própria célula tumoral pela secreção de substâncias denominadas pró-coagulantes tais como: o fator tecidual, o qual é um poderoso agente estimulante da coagulação e também a secreção do câncer pró-coagulante que só é secretado pela célula maligna e também atua ativando a coagulação (PRANDONI et al., 2005; FURIE & FURIE, 2006; BARBERA & THOMAS, 2008). Fatores relacionados ao próprio paciente os quais podem ser desencadeadores de trombose incluem a idade, o sexo, a história pessoal de câncer bem como episódios de tromboembolismo venoso prévio. A associação da trombose com doenças malignas também pode ser resultado da contínua formação e degradação de trombina (PRANDONI et al., 1999; BARBERA & THOMAS, 2008). Também estão inclusos nos mecanismos desencadeadores, os tratamentos como o uso de tamoxifeno, o fluoracil, os compostos de platina, os processos cirúrgicos, a radio e a quimioterapia, bem como o uso de cateteres os quais também podem ser responsáveis por provocar a ativação plaquetária e a conseqüente trombose (CLAGETT et al., 1995; MOSS & HANDERSON, 1996; GOUIN-THIBAUT & SAMAMA, 1999; PRANDONI et al., 1999; BICK, 2003). O risco de tromboembolismo venoso (VTE) é duas vezes maior em pacientes que sofreram algum processo cirúrgico e que têm câncer associado, do que naqueles que sofreram o mesmo processo, porém não apresentam câncer (FIMOIGNARI et al., 2005). O processo cirúrgico causa o dano vascular, o qual pode expor o endotélio e o fator tecidual induzindo a liberação de citocinas as quais ativam a coagulação (BARBERA & THOMAS, 2008). Os pacientes que não fizerem um acompanhamento pós-cirúrgico adequado também têm um alto risco de desenvolver trombose pós-operatória, sendo este risco duas vezes maior do que em pacientes sem câncer (PRANDONI et al., 1999). JACOBSON e colaboradores (2005) descreveram que pacientes tratados com a associação de RTX e QTX tiveram uma incidência aumentada de tromboembolismo, dentre o qual estavam inclusos: a

trombose venosa profunda e embolia pulmonar. A RTX pode romper a célula endotelial causando a liberação de citocinas e a consequente ativação da coagulação (BARBERA & THOMAS, 2008). Uma vez que a trombose é diagnosticada em pacientes com câncer, eles apresentam um pior prognóstico, independente do estágio da doença, da idade, do sítio envolvido, da proximidade da intervenção cirúrgica e da RTX ou QTX. Esse fato faz com que a trombose não seja apenas um indicativo de baixo prognóstico, em pacientes com câncer, mas também uma manifestação do processo pato-fisiológico que contribui para a agressividade do câncer (MORGAN et al., 2002).

Sabe-se que a trombose tanto pode vir acompanhando o processo maligno quanto pode ser considerada a primeira manifestação do câncer (PRANDONI et al., 1999). A prevalência do câncer, descoberto após o diagnóstico de VTE, varia de maneira considerável entre os achados da literatura. Em parte, essas variações decorrem do grau de abrangência dos exames de rotina, das características dos pacientes, bem como das variações sofridas pelo conceito de trombose secundária (OTTEN & PRINS, 2001). Muitas vezes o câncer só é diagnosticado anos após o paciente ter tido algum(s) episódio(s) de VTE, porém não se pode afirmar que o processo maligno não estivesse presente no momento do diagnóstico de VTE, uma vez que uma célula leva pelo menos 2 anos para se diferenciar em uma célula cancerosa e no mínimo mais 2 anos para esta provocar sintomas clínicos (OTTEN & PRINS, 2001).

Os pacientes com doenças malignas, os quais não apresentam trombose, freqüentemente apresentam anormalidades nos testes de coagulação. As células tumorais ativam plaquetas bem como sua agregação, pelo contato direto célula-célula ou por secretarem fatores solúveis como o ADP e a trombina (DENKO & GIACCIA, 2001; DE CICCIO, 2004; PRANDONI et al., 2005). Outro fator associado à coagulação sanguínea e sua correlação com o câncer é a contagem de plaquetas nesses pacientes, em especial pacientes com carcinoma cervical uterino. Verificou-se que uma grande proporção de pacientes com carcinoma cervical tinha associado uma alta contagem de plaquetas. Esses pacientes com trombocitose apresentaram também os maiores tumores. A alta contagem de plaquetas determinou que estes pacientes tinham uma menor probabilidade de sobrevivência do que os pacientes com contagens normais, possivelmente por estas plaquetas facilitarem o estabelecimento de

metástases hematológicas (HERNANDEZ et al., 2000). Neste contexto sugere-se que as plaquetas podem atuar protegendo as células tumorais fazendo com que estas células não sofram a ação do sistema imune do paciente (KARPATKIN & PEARLSTEIN, 1981). Além disso, as plaquetas poderiam secretar fatores de crescimento os quais poderiam estimular a proliferação da célula cancerosa (MUNSON et al., 1995), reafirmando a importância destas células frente a um processo maligno.

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais encontram-se no item “ARTIGOS CIENTÍFICOS”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se compondo os próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

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

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta tese.

7. ARTIGOS CIENTÍFICOS

7.1 Artigo1:

Estado oxidativo em pacientes submetidos à conização e a radiação como tratamentos para neoplasia cervical uterina

**OXIDATIVE STATUS IN PATIENTS SUBMITTED TO CONIZATION
AND RADIATION
TREATMENTS FOR UTERINE CERVIX NEOPLASIA**

Paula Acosta Maldonado, Luiz Augusto Negrini, Rosilene Rodrigues Kaizer,
Rafael Fernandes Zanin, Maria do Carmo Araújo, Vanessa Battisti, Vera Maria Morsch,
Maria Rosa Chitolina Schetinger.

Clinica Chimica Acta, 366 (2006) 174-178



Available online at www.sciencedirect.com



Clinica Chimica Acta 366 (2006) 174–178



www.elsevier.com/locate/clinica

Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia

Paula Acosta Maldonado^a, Luiz Augusto Negrini^a, Rosilene Rodrigues Kaizer^a,
Rafael Fernandes Zanin^a, Maria do Carmo Araújo^b, Vanessa Battisti^a, Vera Maria Morsch,
Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a,*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^b Hospital Universitário de Santa Maria-HUSM, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Received 18 July 2005; received in revised form 26 September 2005; accepted 27 September 2005

Available online 2 November 2005

Abstract

Background: Cervical cancer is a major cause of morbidity among women. We investigated the treatment effect on oxidative status from patients submitted to radiotherapy or conization surgery to high-grade SIL (squamous intraepithelial lesion) treatment, and oxidative profile from patients newly diagnosed for uterine cervix cancer, without treatment.

Methods: We determined the catalase activity in blood, reduced glutathione (GSH) in plasma, TBARS and protein carbonyl content from serum samples of the patients.

Results: The catalase activity, GSH levels, TBARS and protein carbonyl content had no statistical differences related to the controls, neither when the 2 treatments were compared, possibly because the antioxidant defense may be acting in the first period of the neoplastic transformation, and maybe indicating a possible arrest of the tumor cells caused by the efficiency of the treatments. In the non-treated patients, TBARS and protein carbonyl contents, GSH levels and catalase activity were shown to be increased comparing with the treated patients and compared with the controls indicating an tumor effect on oxidative profile, and the antioxidant activity been increased in the beginning of the tumor development.

Conclusions: We suggest that the treatments were efficient in an arrest of the tumor.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Oxidative profile; Uterine cervix cancer; Protein carbonyl; Lipid peroxidation; Catalase; Reduced glutathione

1. Introduction

Uterine cervix cancer, among all the pathologies that affect women, is currently the most common gynecological malignancy [1]. For this reason, it is well accepted that even the early invasive cervical carcinoma must be treated [2]. The risk factors for this disease are the family history of cancer, hormone replacement therapy, smoking, and multiparity among others [3].

The treatments for uterine cancer are applied according to the stage of the disease. Taking into account a micro-

invasive carcinoma, according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging system, the treatment used is the extrafascial hysterectomy. In patients desiring to maintain the fertility, the treatment performed is the conization surgery [2], while radiation therapy is used for inoperable cancers or as an adjuvant therapy after the surgery [4].

Based on FIGO, lesions with invasion no greater than 3 mm in depth and no wider than 7 mm are classified as IA1 stage. Lesions with stromal invasion between 3 and 5 mm, and no wider than 7 mm are classified as IA2 [5].

It is well known the relation between free radicals and cancer, where they may contribute to the neoplastic transformation of cells [6–8]. Free radicals are normally

* Corresponding author. Fax: +55 55 2208978.

E-mail address: maiorca@smail.ufsm.br (M.R.C. Schetinger).

produced by metabolic oxidative processes and are required for many functions, such as immunological system [9]. The molecules frequently damaged by oxygen reactive species (ROS) are the proteins, the lipids and the DNA [10].

The proteins are the first biological molecules for oxidative damage on cells, and their side chains may be carbonilated by reactive carbonyl compounds [11]. The number of diseases which may damage the proteins is large, and among them we find the cancer [12]. With respect to lipids, oxidative damage leads to the formation of products like malondialdehyde (MDA), which can be spectrophotometrically measured [13]. Although the body presents enzymatic antioxidant defenses, such as catalase and reduced glutathione (GSH), both involved in scavenging reactive oxygen species [8], in some conditions like oxidative stress we have an imbalance toward the pro-oxidative side of the pro-oxidant/antioxidant homeostasis [11]. In these cases the DNA damage may lead to mutagenesis, carcinogenesis and cell death [13]. In some studies high levels of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) in the circulation of cervical cancer patients [14] were demonstrated.

The ionizing radiation, used like a treatment for uterine cervix cancer, leads to the production of hydroxyl radical, which indiscriminately attacks neighboring molecules [4]. Despite these findings, little is known about the effects of surgery treatment on oxidative status, about the time effect on the production of ROS after the surgery is performed and after the end of the radiation treatment and also if the free radical production could be signaling a tumor recurrence in cases where the treatments were already done.

Therefore, our study aimed to verify the lipid peroxidation using TBARS content determination, the protein oxidative profile using protein carbonyl assay, and the antioxidant defense using the catalase activity and reduced glutathione (GSH) level as parameters. The study was carried out with a group of women who received the diagnostic for high-grade SIL (squamous intraepithelial lesion) and who were already treated by either conization or radiation, and other group composed by women newly diagnosed for uterine cervix cancer and whose did not received any treatment.

2. Patients and methods

2.1. Patient selection

For this study we selected 35 patients from Gynecology Ambulatory of Federal University of Santa Maria Hospital, age range of 25–67 years. The patients included in this study received the diagnostic for high-grade SIL, and based on their diagnostic they were divided by the treatments performed to treat the malignancy as described above: the first group, age range of 25–54 years, was composed by

17 patients submitted to conization surgery and the second group was composed by 12 patients submitted to radiotherapy (RTX), and the age range of 38–67 years. After the treatments were performed the patients were followed up at the same hospital to evaluate the treatments' efficiency and at this period we collected a single blood sample.

The third group was composed of 6 newly diagnosed uterine cervix cancer patients, age range of 56–65 years, whose had not undergone any previous treatment for their tumors. Their blood were collected few days after their diagnostic was obtained. The control group was composed by 20 women (age range of 25–56 years) who presented no disease, no smoking history and that made no use of pharmacological therapy until the moment of the blood sampling. The study was approved by the Human Ethical Committee of Federal University of Santa Maria, protocol number 126–04, Brazil. All the participants signed the free consent before the blood were collected.

The colposcicology finding was the screening basis to differentiate patients with high-grade SIL and uterine cervix cancer from the control group and women had their results confirmed by biopsies. The patient's general characteristics are shown on Table 1.

2.2. Sample collection

The blood was collected in vacutainer tubes without anticoagulant system. After the collection, the blood was centrifuged at 5000 rpm for 10 min, the precipitated was discarded and the serum was used to make the TBARS and the protein carbonyl analysis. For the catalase activity, the blood was collected in citrated vacutainer tubes and the total blood was diluted 1:10 in saline solution to make the determination. For reduced glutathione determination, we collected the blood using EDTA as anticoagulant and the plasma was used to execute the determination.

2.3. Carbonylation of serum protein

The carbonylation of serum proteins was determined by modifications of the Levine's method [15]. Firstly, from 1 ml of serum, the proteins were precipitated using 0.5 ml of

Table 1
General characteristics of the patients

General characteristics			
Treatment modalities	Stage of the disease	Age range (year)	N ^a
Conization	HSIL ^a	25–54	17
Radiotherapy	HSIL ^b	38–67	12
Non treated	Uterine cervix cancer ^c	56–65	6
Control		25–56	20

^{a,b}HSIL, High-grade Squamous Intraepithelial lesion. Stage of the disease before the treatments were performed.

^cNewly diagnosed uterine cervix cancer patients.

^aN, number of patients included in each group.

10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 5000 rpm for 5 min discarding the supernatant. One half milliliter of 10 mmol/l 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/l HCl was added to this precipitated protein and incubated at room temperature for 30 min. During the incubation time the samples were mixed vigorously every 15 min. After the incubation time, 0.5 ml of 10% TCA was added to the protein precipitated and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. After discarding the supernatant, precipitates were washed twice with 1 ml of ethanol/ethylacetate (1:1), each time centrifuging out the supernatant in order to remove the free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 ml of protein dissolving solution (2 g SDS and 50 mg EDTA in 100 ml 80 mmol/l phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37 °C water bath for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using spectrophotometer at 370 nm against 2 mol/l HCl. Carbonyl content was calculated by using molar extinction coefficient (21×10^3 l/mol cm) and results were expressed as nanomoles per milligram protein.

2.4. Catalase activity and reduced glutathione level

The determination of catalase activity was done by modifications in the method of Nelson and Kiesow [16]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to the catalase dependent decomposition of hydrogen peroxide. Aliquot (0.02 ml) of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was started by the addition of 0.07 ml of aqueous solution of hydrogen peroxide 0.3 mol/l. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. The catalase activity was calculated using molar extinction coefficient ($0.0436 \text{ cm}^2/\mu\text{mole}$) and the results were expressed as picomoles per milligram protein.

Reduced glutathione (GSH) was determined in plasma by the method of Ellman [17]. Aliquots (0.1 ml) of plasma 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). The results were expressed as micromoles per milliliter $\mu\text{mol/ml}$ plasma.

2.5. Determination of lipid peroxidation

The lipid peroxidation was estimated by the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum samples by modifications of the method of Jentsch et al. [18]. Briefly, 0.2 ml of serum was added to the reaction mixture containing 1 ml of 1% *ortho*-phosphoric acid, 0.25 ml alkaline solution of thiobarbituric acid-TBA (final volume 2.0 ml) followed by 45 min heating at 95 °C. After cooling, samples and standards of malondialdehyde were read at 532 nm against the blank of the standard curve. The results were expressed as nanomole MDA per milliliter. The biochemical data are expressed as mean \pm SD.

2.6. Statistics

Statistical significance was analyzed using ANOVA one way test followed by post hoc comparisons by Duncan's analysis.

3. Results

3.1. Lipid peroxidation

The lipid peroxidation estimated by TBARS levels in patients submitted to radiotherapy (RTX) and conization and from the patients with uterine cervix cancer whose had not received any treatment is shown in Table 2. No statistically significant relationship was found between the treatments and the controls, nor when the 2 treatments were compared between them. However, the TBARS content was shown to be increased in the non-treated patients related to the control and also when compared with the other 2 treatments ($*p < 0.05$).

3.2. Protein carbonyl content

The protein oxidation, determined by protein carbonyl content in serum samples from the patients, is shown in Table 2, and the results reveal no significance between the 2 treatments neither compared to the controls, but the non-treated group the protein carbonyl content

Table 2
Circulating pro-oxidants and antioxidant levels in cervical cancer patients and normal subjects

Parameters	Controls (n=20)	Conization treated group (n=17)	RTX treated group (n=12)	Non-treated ^a (n=6)
TBARS (nmol MDA ^b /ml)	8.52 \pm 1.66	6.93 \pm 1.51	8.08 \pm 2.05	12.98 \pm 1.72*
Protein carbonylation (nmol/ml)	0.85 \pm 0.10	0.83 \pm 0.41	0.74 \pm 0.25	1.16 \pm 0.15*
Catalase (pmol /mg of protein)	3.78 \pm 0.83	2.68 \pm 0.93	3.67 \pm 1.18	12.21 \pm 1.33*
GSH ^c ($\mu\text{mol/ml}$ of plasma)	0.80 \pm 0.16	0.79 \pm 0.14	0.85 \pm 0.08	1.56 \pm 0.13*

^a Non-treated is the group newly diagnosed for uterine cervix cancer.

^b MDA, malondialdehyde.

^c GSH, reduced glutathione. Data are presented as mean \pm SD.

* $p < 0.05$ as compared with controls and the other groups.

revealed to be increased when compared with the conization and the radiotherapeutic's treatments and controls ($*p < 0.05$).

3.3. Antioxidant catalase activity and reduced glutathione (GSH)

The catalase activity and GSH, were also not significant when compared the treatments and the controls or when the comparison was done between the 2 different types of treatments (Table 2). In the non-treated group, the catalase antioxidant activity and GSH levels were also increased when related to the other groups ($*p < 0.05$).

4. Discussion

The oxidative stress occurs when the production of ROS exceeds the antioxidant capacity of the body [19]. Normally, the electron transport chain is involved in metabolizing the oxygen, but it is estimated that about 1% or 2% be converted to oxygen radicals [20]. These ROS are known for inducing oxidative damage on cellular components, such as lipids, protein denaturation and DNA damage [21].

Lipids damage induces the phenomenon known by lipoperoxidation culminating in malondialdehyde (MDA) formation, which is a very cytotoxic product that acts as a tumor promoter and carcinogenesis inductor [8].

Some studies have shown that 10–20 days after radical operations the MDA plasmatic levels decreased, reaching values close to the healthy people [22] and in patients with cervical cancer the lipid peroxidation was increased when related to controls [4] so our results agree with this findings. The MDA levels were increased in the group of patients newly diagnosed for uterine cervix cancer, when compared with the other groups.

In our study we found neither difference, for the MDA levels, between the 2 treatments, conization or radiotherapy, nor when related to the controls, possibly because these patients had effective tumor recuperation with no recurrence. It was suggested by other study an inverse relationship between the lipid peroxidation and the rate of cell proliferating, with decreased lipid peroxidation in tumor tissues and enhanced lipid peroxidation in the circulation of cancer patients [10]. At our case the results can also be explained because the patients were already treated long time ago (about 2 or 3 years), so it can be considered that the time after the treatments were over, have caused these results, indicating possibly an improvement in the clinical state of the patients. This theory is also supported by a study showing that six months after the end of brachytherapeutic's treatment, the TBARS plasmatic and erythrocyte levels returned to normal, indicating the arrest of tumor growth as a result of the treatment [4].

Proteins are also good markers of oxidative damage. Such markers were found to be increased in some types of

cancer, such as metastatic prostate cancer [23]. Our findings also revealed increased protein oxidation in the group of patients newly diagnosed for uterine cervix cancer and whose had received no type of treatment. In our study we also estimated the protein oxidation in serum samples of patients already treated for uterine cancer with conization or radiotherapy. The results showed no significant alterations between the 2 types of treatments neither when it was compared to the controls. We believe that these findings must be result of the time past since the treatments were done until the blood sampling and that these treatments could be really efficient.

There are many publications that reveal the cancer effect on antioxidant system. Most of them agree that the catalase levels are decreased in the circulation of such patients [22,23] and that the GSH levels controls the onset of tumor cell proliferation [24], others say that the antioxidant defense may be acting in the beginning of neoplastic transformation [14]. We also found in this paper that the catalase antioxidant defense and reduced glutathione were significantly increased in the patients newly diagnosed for uterine cervix cancer, when compared with those submitted to conization or radiotherapy and also when compared with the controls been our findings in agreement with the literature, that shows increased antioxidant defense in the beginning of the tumor development [14] and other study also showed rapid GSH synthesis in tumor cells [19]. Chiu et al. [19] also reported that alterations in antioxidant enzyme activities in patients with gynecological pathologies may be due to the type or extent of tissue damage.

With respect to the catalase activity in blood and GSH of patients submitted to conization surgery or radiotherapy we found no differences between the treatments and also no statistical significance was found between them and the controls. This could be explained by the treatments performed, which probably have caused the arresting of the tumor.

In conclusion, the oxidative profile of biological molecules, like proteins and lipids represented by TBARS content and protein carbonylation, respectively and the antioxidant defense, here represented by catalase activity and GSH levels, showed no significant change in patients treated with either conization or radiotherapy neither when they were compared with the controls. Thus, our findings suggest that the time after the end of both treatments until the day of the blood collection could be responsible for this profile, taking us to conclude that both the treatments were effective and culminate for the recovery of the patients.

On the other hand the patients whose were newly diagnosed for uterine cervix cancer and were not treated, presented statistically significance for TBARS, protein carbonylation contents, catalase antioxidant activity and GSH levels compared to those already treated by conization or radiotherapy but also when compared to the control group, it is in agreement with the literature that shows

increased antioxidant activity mainly in the beginning of neoplastic transformation and increased oxidative profile in the circulation of such patients. Thus, we can conclude that the treatments applied for that women group, taking as parameter the oxidative profile, were efficient, once we found no statistically significance between the treatments and the controls.

References

- [1] National Cancer Institute, accessed in October, 2004.
- [2] Kasamatsu T, Okada S, Tsuda H, et al. Early invasive adenocarcinoma of the uterine cervix: criteria for nonradical surgical treatment. *Gynecol Oncol* 2002;85:327–32.
- [3] www.oncolink.org, accessed in September, 2004.
- [4] Kierzenkowska CM, Komatowska AW, Drewa T, et al. The effect of brachytherapy on antioxidant status and lipid peroxidation in patients with cancer of the uterine cervix. *Cell Mol Biol Lett* 2004;9:511–8.
- [5] Staging classifications and clinical practice guidelines of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2003.
- [6] Kumaragunapalan R, Subapriya R, Viswanathan P, Nagini S. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin Chim Acta* 2002;325:165–70.
- [7] Cook JA, Glas D, Wink DA, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB. Oxidative stress, redox, and tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol* 2004;14:259–66.
- [8] Senthil K, Aranganathan S, Nalini N. Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clin Chim Acta* 2004;339:27–32.
- [9] Donne ID, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003;9:169–76.
- [10] Manja V, Sallaja JK, Nalini N. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case control study. *Clin Biochem* 2002;35:621–5.
- [11] Donne ID, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23–38.
- [12] Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32(9):790–6.
- [13] Manoharan S, Kalanjappan K, Kavalivithi M. Enhanced lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma. *Cell Mol Biol Lett* 2004;9:699–707.
- [14] Kim YI, Kim JW, Choi JS, Kim SH, Choi EK, Cho NH. Relation between deranged antioxidant system and cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14:889–95.
- [15] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464–78.
- [16] Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972;49:474–8.
- [17] Ellman GL. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;32:70–7.
- [18] Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Bischoff HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251–6.
- [19] Chiu JF, Hu ML. Elevated lipid peroxidation and disturbed antioxidant enzyme activities in plasma and erythrocytes of patients with uterine cervicitis and myoma. *Clin Biochem* 1999;32:189–92.
- [20] Dewese TL, Huszczyk AM, Mamett LJ. Oxidative stress in chemoprevention trials. *Urology* 2001;57(Suppl 4A):137–40.
- [21] Cassat M, Corso F, Corrocher R. Free radicals in human pathology. *Recent Prog Med* 1991;32:39–44.
- [22] Hristov D, Galjeva V, Vlaykova T, Dimitrov G. Evaluation of oxidative stress in patients with cancer. *Arch Physiol Biochem* 2001;109(4):331–6.
- [23] Pathak SK, Sharma RA, Steward WP, Mellon JK, Griffiths TRL, Gescher AJ. Oxidative stress and cyclooxygenase activity in prostate carcinogenesis: targets for chemopreventive strategies. *Eur J Cancer* 2005;41:61–70.
- [24] Obrador E, Navarro I, Mampo I, Asensi M, Pellicer JA, Estrela JM. Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo. *Biochem J* 1997;325:183–9.

7.2- Artigo 2:

Enzimas que degradam nucleotídeos em plaquetas de pacientes tratadas com conização ou radioterapia para neoplasia cervical uterina

**NUCLEOTIDE DEGRADING ENZYMES IN PLATELETS FROM
PATIENTS TREATED WITH CONIZATION OR RADIOTHERAPY FOR
UTERINE CERVIX NEOPLASIA**

Paula Acosta Maldonado, Luiz Augusto Negrini, João da Silva Ethur, Rafael Fernandes Zanin, Lara Vargas Becker, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger.

Title of the article: NUCLEOTIDE DEGRADING ENZYMES IN PLATELETS FROM PATIENTS TREATED WITH CONIZATION OR RADIOTHERAPY FOR UTERINE CERVIX NEOPLASIA

Authors: Paula Acosta Maldonado^a, Luiz Augusto Negrini ^a, João da Silva Ethur ^b, Rafael Fernandes Zanin ^a, Lara Vargas Becker ^a, Vera Maria Morsch ^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger ^a.

Name of the Department: ^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. ^bAmbulatório de Ginecologia, Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Corresponding author:

Dr (a). Maria Rosa Chitolina Schetinger

Departamento de Química/CCNE

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria RS Brasil - 97105-900

e-mail: mariaschetinger@gmail.com or

mariarosa@smail.ufsm.br

Abstract

Introduction: Uterine cervix neoplasia is an important worldwide health problem. The malignancy is frequently associated with thrombosis, in which platelets play an important role. The ectonucleotidases are membrane bound enzymes present in platelets, been responsible for hydrolyzing adenine nucleotides in the extracellular medium. Taking into account the importance of these enzymes in thromboregulation process we aimed to investigate their activity related to uterine cancer.

Materials and methods: In this work we evaluated the NTPDase and 5'-nucleotidase activities from patients previously treated for uterine cervix neoplasia either with conization or radiotherapy (RTX). These patients were divided into two groups for conization (I and II) and two for RTX (III and IV), based on the amount of time that had passed since the termination of the treatments, as follows: groups I and III (treated more than one year until five years earlier), II and IV (recently treated, until three months earlier).

Results: For the conization treated group ATP and ADP hydrolysis decreased in group I (39.12% and 46.9%) compared to control and also decreased (36.08% and 40.78%) related to group II, respectively. AMP hydrolysis, for this group, also decreased in groups I (47.42%) and II (39.51%) compared to the control group. For the RTX treated group ATP and ADP hydrolysis decreased (36.76% and 36.55%) in group III related to control and also decreased (30.76% and 36.71%) related to group IV. AMP hydrolysis decreased in group IV (36.07%) compared to group III and groups III and IV decreased (42.96% and 79.42%) compared to the control group. There was a reduced platelet aggregation in groups I, II and III (12.41, 10.62 and 11.45%) for ADP at 2.5 μ M, (16.85, 14.43 and 14.08%) for ADP at 5 μ M and (8.5, 9.04 and 9.29%) for ADP at 7.5 μ M. For collagen there was a reduced aggregation in groups I, II and III (11.89, 12.37 and 12.13%) at 2 μ g/ml.

Conclusions: As a general characteristic, we observe that the treatments for uterine neoplasia caused a decreased hydrolysis in ATP, ADP and AMP. The coagulation parameters as well as platelet aggregation help to ensure the tumor cells elimination as a consequence of the treatments efficiency. NTPDase causes a

protection against platelet aggregation and 5'-nucleotidase protects against adenosine formation.

Keywords: Uterine cervix neoplasia, thrombosis, platelets, ectonucleotidases, adenine nucleotides.

1. Introduction

Platelets act as essential molecules which are responsible for maintaining the normal hemostasis. They help to ensure normal blood circulation, acting mainly in the primary hemostatic process [1]. Such cells may be activated by many conditions, among which we can include cancer [2]. More than 30% of the cancer patients have thrombocytosis and less than 11% have thrombocytopenia [3, 4]. The thrombocytosis is associated with a poor prognostic factor for patients with cancer [5] once that platelets may act protecting tumor cells and also increasing the metastasis establishment [6].

Thrombosis is one of the major complications of cancer [7]. Clinical manifestations vary from venous thromboembolism (VTE) to disseminated intravascular coagulation and arterial embolism [8]. The prothrombotic state associated with the malignancy is due to complex and not fully recognized interactions between cancer and the haemostatic system, which can promote a shift in the balance of procoagulants versus anticoagulants. Malignant cells can activate the coagulation system in several ways which include: production of procoagulant, fibrinolytic and proaggregating activities, proinflammatory and proangiogenic cytokines release, and direct interaction with host vascular and blood cells, such as platelets by means of adhesion molecules [8].

Patients with malignant disorders, but not thrombosis, commonly present abnormalities in laboratory coagulation tests [8], and there is also some evidence that the activation of the coagulation system, caused by the tumor, is intrinsically involved in tumor growth, angiogenesis and metastasis [3].

It has already been widely reported that uterine cervix neoplasia is one of the leading causes of death worldwide. This malignancy only loses place to breast cancer, which occupies the first position in relation to mortality [10, 11].

In recent years, the early detection and treatment of the preinvasive uterine disease have been possible due to the introduction of the Papanicolaou smear. The treatment choice for this pathology includes many factors such as the stage of the disease, the patient intention of maintaining fertility, the tumor size and extension and mainly the own characteristic of each tumor, among others. Radiotherapy (RTX) is the

most standard treatment used to uterine neoplasias, and it may be used in almost all the stages of the disease, while surgery, specifically conization surgery, is limited only to the initial phases [12]. Conization is a conservative method that is used to remove only the neoplastic zone which contains the abnormal cells and, with this, preserves the uterine function at the same time [13].

Some therapies, such as radiation and surgery, may be responsible for the procoagulant effects associated with cancer [8]. It has been reported that patients with cervical cancer treated with concurrent chemotherapy, radiation and erythropoietin have an increased incidence of symptomatic venous thrombosis [14]. The RTX may disrupt the cells causing the liberation of cytokines and inducing the aggregation process. Regarding surgical treatment, a study revealed that up to 30 days after surgery there was clinically symptomatic incidence of venous thromboembolism [15]. The surgery causes the vascular damage, also causing the liberation of cytokines which activate the coagulation process.

Our body displays mechanisms of defense to regulate or inhibit the thrombus formation, which together are defined as thromboregulation, which is characterized as a group of processes involved in maintaining the blood fluidity, culminating with the inhibition of thrombus formation [16]. Enzymes, such as ectonucleotidases, are known for participating in this process by scavenging adenine nucleotides in the extracellular medium [16, 17, 18].

Ectonucleotidases, such as NTPDases (ecto-nucleoside triphosphate phosphohydrolase, E-NTPDase/CD39), are present in many cells, including platelets, and they act by hydrolyzing extracellular nucleotides to the respective nucleosides. The enzymatic chain, or cascade, is initiated by NTPDases and is terminated by 5'-nucleotidase, which also is an enzyme present in the platelet surface. NTPDase degrades ATP into ADP which, in turn, is converted to AMP. Subsequently, 5'-nucleotidase converts AMP into adenosine [19, 20].

Molecules, such as ATP, ADP and adenosine, are present in the extracellular medium at low concentrations, at physiological conditions, but their concentrations may be increased as a consequence of various mechanisms, including cell lyses, selective

permeabilization of the plasma membrane and exocytosis of secretory vesicles, such as platelet dense bodies [18].

Extracellular nucleotides modulate several functions including development, blood flow, secretion, inflammation, platelet aggregation and immune reactions [20]. ATP plays important roles in several biological processes, such as proliferation, differentiation and development of cells [21]. NTPDase acts in the regulation of thrombus formation by hydrolyzing the nucleotides mentioned above, mainly by inactivating ADP, which is considered the main platelet recruiting agent [22].

Due to their rapid growth, solid tumors routinely experience severe hypoxia and necrosis, which may lead to nucleotide degradation and adenosine release. Adenosine has many effects that favor malignancy, such as protection against ischemia, stimulation of growth, angiogenesis and suppression of the immune response [23, 24].

Thus, the role of ectonucleotidase as a thromboregulator is very important in cases of malignant disease, since these patients frequently present thromboembolic diseases [24]. It has been observed in some studies of our research group that such platelet enzymatic activity is modified in some diseases. Some of them, such as diabetes and hypertension, revealed an increase in the activity [25] and others, such as breast cancer, presented either an increase or a decrease according to the stage of the disease [26].

Considering that thrombosis may precede a cancer diagnostic or cancer may be accompanied by thrombosis, and also that many times it happens in face of the treatments adopted, our objective with this work was to evaluate the real effect of conization and radiotherapy, used as treatments for patients with uterine cervix neoplasia, on NTPdase and 5'-nucleotidase activities, which are enzymes involved both in the thromboregulation and adenosine formation. Furthermore, the focus was also to verify if the results could be related with the complete tumor elimination, which is confirmed by the coagulation parameters, platelet aggregation as well as by the cytopathologic screening in the patients.

2. Patients and methods

2.1 Chemicals

Nucleotides, HEPES, and Trizma base were purchased from Sigma (St, Louis, MO, USA). All the other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2 Patient selection

The patients included in this work were diagnosed for high grade squamous intra epithelial lesion (HGSIL) at the Federal University of Santa Maria Hospital. The treatments adopted for each patient were not only based on particular characteristics of the lesions, such as size, extension or damage, but also on the patient situation, as the possibility of maintaining the fertility, the possibility of each patient be submitted to a surgery and the presence of inoperable tumors. After the appropriate evaluation of the cases, the patients received the treatments, by means of either conization or radiotherapy. They were seen at the same hospital during and after the entire treatment period. Thus, the use of conization and radiotherapy, as treatments, made possible to accompany alterations in ectonucleotidases activities caused by different techniques: surgery and radiation.

The blood sample was collected, in vacutainer citrated tubes, when the women returned to the hospital to verify the effect of the treatment on tumor development.

The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria under the number 126/2004, and all the patients signed the written consent. The patients were divided into two main groups based on the therapies adopted to treat their tumors, which were conization (n=27) and RTX (n=23). The conization and RTX treated groups were subdivided into two other groups based on the time past since their treatments had finished. The conization group was subdivided into group (I), which consisted of 14 women treated more than 1 year until five years earlier; group (II), which consisted of 13 patients recently treated (until three months earlier). The RTX group was subdivided into group (III) composed of 15 women treated more than one year until five years earlier; and

group (IV) composed of 8 patients recently treated (until three months earlier).

The control group was composed of 30 healthy women who had no malignant pathology, no history of smoking or pharmacological therapy, no alcoholism dependence and with an age range similar to the test group. The general characteristics of the patients are shown in Table 1.

2.3 Coagulation parameters, hematocrit levels, white blood cell count and cytopathologic screening

2.3.1 Prothrombin (PT), parcial thromboplastin (APTT) times, platelet's count and platelet aggregation

PT and APTT were determined with a Coag-a-mate-MTX apparatus (Organon Teknika, Durham, NC, USA). PT was expressed as percentage of activity and APTT was expressed in seconds. Quantitative determinations of platelets, obtained by blood collection, were performed using a Coulter-STKS analyzer (Miami USA) and was expressed as quantity per mm^3 .

The platelet aggregation profile was done in Chrono-LOG aggregometer using ADP (2.5, 5 and 7.5 μM) and collagen (2, 5 and 7.5 $\mu\text{g/ml}$) as agonists in the concentrations indicated in parenthesis and the results were expressed as percentage of aggregation.

2.3.2 Hematocrit level, white blood cell count (WBC)

Hematocrit levels and white blood cell count were performed using a Coulter-STKS analyzer (Miami USA) and the results for hematocrit were expressed as percentage of red blood cells and the WBC was expressed as quantity per mm^3 .

2.3.3 Cytopathologic screening

The cytopathologic screening was done by Papanicolaou smears.

2.4 Platelet rich plasma preparation (PRP)

The PRP was prepared according to Pilla et al. [27], with minor modifications. Briefly, the blood was collected into 0.129 M citrated vacutainer tubes and it was centrifuged at 500 rpm for 10 minutes. After this, the PRP was centrifuged at 3700 rpm for 30 minutes and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, which contained 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and the protein was adjusted to 0.4-0.6 mg/ml for the determination of ectonucleotidases activities. The integrity of the platelet preparation was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity using the labtest kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

2.5 NTPDase and 5'-nucleotidase activities

The determination of ectonucleotidase activities was carried out using the PRP preparation according to Pilla et al. [27]. Briefly, to determine the NTPDase activity, twenty microliters of the PRP preparation was added to the system mixture, which contained 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM tris-HCl buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of 20 microliters of ATP or ADP (1 mM) as substrates. For AMP hydrolysis, the 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 and the nucleotide added was 2 mM AMP [27].

Both reactions were stopped by the addition of 200 μl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. After this, the inorganic phosphate released by ATP, ADP and AMP hydrolysis was determined in triplicate by the method of Chan et al. [28] using KH_2PO_4 as standard. The same process was carried out on the control tubes to exclude non enzymatic hydrolysis, by adding twenty microliters of

protein to the reaction medium after TCA. The results were expressed as nmol inorganic phosphate released/ minute/ miligram of protein (nmol Pi released/ min/ mg protein).

2.6 Protein determination

The protein was determined by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) [29] using bovine serum albumin as standard.

2.7 Kinetic determination

Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) values, for ATP, ADP and AMP hydrolysis, were calculated using the Lineweaver-Burk plot. The substrates were used in the range 15-1500 μ M, for ATP and ADP, and 25-2500 μ M, for AMP.

2.8 Statistical analysis

The patients were divided into two groups for each of the two treatments (RTX or conization) based on the time past since such treatments had finished. The one way ANOVA followed by DUNCAN'S *post-hoc* comparisons was done to evaluate the differences within each group of treatment. Test-*t* was done to evaluate if there were differences between the two treatments.

3. Results

3.1 Prothrombin, parcial thromboplastin times, platelet's count and aggregation

Prothrombin, parcial thromboplastin times and platelet's count are expressed in Table 2.

These parameters were considered to be at normal range with no significantly changes. The platelet aggregation using ADP at all concentrations and collagen in 2

$\mu\text{g/ml}$ showed to be decreased in groups I, II and III related to control. These results are shown in table 3.

3.2 Hematocrit levels, white blood cell count and cytopathologic screening

The parameters cited above are described in Table 2. Hematocrit levels and white blood cell count are in normal values. The cytopathologic screening results are considered compatible with the normality, showing a possible arrest of tumor in face of the absence of tumor cells.

3.3 LDH determination

Almost 4% of the platelets were disrupted indicating that the preparation was predominantly intact, as observed by LDH determination (data not shown).

3.4 ATP, ADP and AMP hydrolysis

Figure 1 shows ATP hydrolysis, which was decreased in the groups treated more than one year until five years (I and III) when compared to the other groups for both conization and RTX (Figure 1A and 1B) ($p < 0.05$).

Results for ADP hydrolysis are shown in Figure 2. The results showed that for both conization (Figure 2A) and RTX (Figure 2B), ADP hydrolysis was decreased in the groups I and III when compared to the other groups ($p < 0.05$).

AMP hydrolysis, for both conization and RTX treated groups, is shown in Figure 3. Groups I, II, III and IV presented a decrease in AMP hydrolysis (Figures 3A and 3B) when compared to the control group, and group IV also showed a decrease compared to group III ($p < 0.05$).

Comparisons were also made for nucleotide hydrolysis between the two treatments by t-student test, and they showed that AMP hydrolysis in group IV, treated by RTX, was significantly reduced compared to conization group II (Figure 4). The other nucleotide's hydrolysis were not significantly changed (data not shown).

4. Discussion

Staging of cervical cancers is based on the clinical evaluation of patients and all the cases must be carefully examined to ensure adequate treatment [30]. Considering the importance of establishing an adequate treatment to assure the patient survival, even the early stages must be treated [31].

Cancer growth is associated with the development of a hypercoagulable state and platelets play a pivotal role in this process. The activation of blood coagulation, in cancer patients, is a very complex process and includes several causes. Clinical settings involving cancer are responsible for the induction of VTE, among which are chemotherapy, the placement of venous catheters, abdominal pelvic surgery as well as radiotherapy [32]. Thromboregulation is characterized as an interaction between blood cells, such as platelets, and the vessel wall in an attempt to regulate or inhibit thrombus formation [17]. Among the factors known for participating in this process, is the activity of ectonucleotidases. In this study, the enzyme activities were modified in accordance with the amount of time past after the end of the treatments.

The results shown in this paper reveal that ATP hydrolysis decreased in patients treated until five years before with either RTX or conization. This could suggest that the low activity of NTPDase contributes to the low formation of ADP, and with less ADP being formed its hydrolysis was also reduced, in the same groups. This nucleotide may induce the thrombosis [17, 18], and this situation occurs during cancer development. ADP causes, in human platelets, aggregation, shape change, increase in cytosolic calcium and inhibition of stimulated adenylate cyclase [33]. Moreover, cancer has also been associated with platelet activation and with disorders in blood coagulation [8, 32]. Thus, these patients may not present any significant platelet activation, as confirmed by the aggregation profile.

A common situation also described is the fact that patients who suffered surgery and received no adequate prophylaxis face a very high risk of developing venous thromboembolism postoperatively [34]. Our findings show that patients treated recently presented enhanced ATP hydrolysis, only related to the other treated groups, which could be a result of the recent end of the treatments, conization and RTX, since both of

them are recognized as risk factors for thromboembolic disorders and consequently platelet activation. Therefore, this fact could be causing a little activation of such platelets which, in turn, contributes to the alteration of NTPDase activity.

The enhanced ADP hydrolysis found in the groups treated most recently, both by conization and RTX, could be contributing to the degradation of a thrombosis promoter and possibly acting with a protective function preventing the illicit platelet activation, although this enhancement was only related to the groups treated long time ago, not related to control group.

In relation to 5'-nucleotidase activity in the conization treated group, AMP hydrolysis was decreased in both two groups when compared to the control. This condition suggests that AMP may not be giving rise to adenosine. Thus, this treatment may be effective in stopping the tumor development because the production of adenosine, which has tumor promoting functions, was reduced [24, 35]. These results are supported by the literature, which states that 5'-nucleotidase activity is elevated in certain tumors. Adenosine, produced by ecto 5'-nucleotidase, may stimulate angiogenesis in hypoxic solid tumors. Hypoxia may increase the expression of the enzyme which generates adenosine [36]. Borowiec et al. [37] reported that when adenosine acts at A_{2A} receptors, it promotes the vasodilatation of capillary blood vessels, which may contribute to reduce tumoral hypoxia. Adenosine has also an angiogenic effect because it stimulates the proliferation of human endothelial cells and the expression of the vascular endothelial growth factor [24, 38].

AMP hydrolysis, for RTX, also decreased in groups III and IV when compared to control and this hydrolysis in group IV, which had been recently treated, was also reduced when compared to group III. Therefore, we may propose that, as the conization treated group, adenosine was not produced, and this effect is much more visible in most recently treated group.

The comparisons between the two different treatments revealed that only AMP hydrolysis was significantly altered in a way that was more reduced in RTX recently treated group when compared to the same group treated by conization. Thus, conization causes more Ado formation. Since we know that any cirurgic process may cause platelet activation, the enhanced AMP hydrolysis found in conization recently

treated group could be reflecting a compensatory mechanism triggered off by surgery in an attempt that enhancing adenosine formation it leads to vasodilatation and consequently reduces or prevents the platelet activation.

Another study that shows coagulation abnormalities in cancer is from De Cicco [3], in which over 50% of patients with malignancy and up to 90% of those with metastatic disease presented coagulation abnormalities. Overall, the most common abnormalities are the prolongation of the PT and APTT, which were not present in this study. We can assume that the treatments may be effective in preventing the prolongation of the PT or APTT corroborating with the affirmative which prevents tumor development. The reduced platelet aggregation found in all the treated groups, except for RTX group IV, related to control, may be an indicative that these treatments were effective in controlling the tumor cells proliferation, since when tumor cells are present they may cause an activation of coagulation, activating platelets as well. Although RTX represents a treatment that can cause damage to cells incurring in platelet aggregation, it is possible that these effects occur soon after the end of this or they may depend on how many sessions of RTX were made. Collagen changed platelet aggregation in the same way as ADP did, but only at the minor concentration (2 $\mu\text{g/ml}$), neither when its concentrations were enhanced it did not change this parameter. This result could suggest that the patients had not hyperaggregant platelets or it may be a result of the collagen low power as an agonist.

Another fact that gives emphasis to our hypothesis of a possible culmination of the tumor cells by the treatments, is the fact described by Munson et al. [39], which indicates that the platelets may secrete growth factors that could stimulate the cancer proliferation. Hernandez et al. [40] described the association between elevated platelet count (thrombocytosis) and a poor prognostic of cancer. A study showed that patients with thrombocytosis had a decreased hematocrit and increased white blood cells (WBC) count [5], or laboratorial alterations which are indicative of thrombosis include: prolonged APTT or high hematocrit level [41]. Since all these parameters were within the normal range, it enhances our probability of arresting tumor growth because no platelet alterations, WBC nor hematocrit were observed.

Besides, we verified the cytopathologic screening carried out, approximately monthly, in the patients in order to verify the efficiency of the treatments, which showed benign alterations according to the normality that may confirm a possible tumor control.

The results of this study provide valuable information that both NTPDase and 5'-nucleotidase activities are altered by the time and by the types of treatments. This could possibly be considered a profile of treated uterine cervix neoplasia where the treatments may be partially responsible for altering the activities of such enzymes. NPTDase activity seems to be involved in controlling platelet aggregation and 5'-nucleotidase looks like to be involved in the control of adenosine concentrations in blood stream. As we know, thromboregulation is a process that includes the association of blood cells, such as platelets, and the cells of the vessel wall. Taking into account the fact that both of them present the ability to hydrolyze adenine nucleotides, along with the fact that endothelial cells present higher activity than the platelets, we must point out that platelets are mobile and populous being easy to recruit.

Acknowledgements

This study was supported by (CNPq), FAPERGS, CAPES and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

References

- [1] Olas B, Wachowicz B, Mielicki WP (2001) Cancer procoagulant and blood platelet activation. *Cancer Letters* 169:165-171.
- [2] Lin J, Proctor MC, Varma M et al (2003) Factors associated with recurrent thromboembolism in patients with malignant disease. *J Vasc Surg* 37: 976-983.
- [3] De Cicco M (2004) The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 50:187-196.
- [4] Bick RL (1992) Coagulation abnormalities in malignancy: a review. *Sem Thromb Hemost* 18:353-372.
- [5] Hernandez E, Donohue MA, Anderson LL et al (2000) The significance of thrombocytosis in patients with locally advanced cervical carcinoma: A gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 78:137-142.
- [6] Karpatkin S, Pearlstein E. Role of platelets in tumor cell metastases (1981). *Ann Intern Med* 95:636-641
- [7] Furie B, Furie B (2006) Cancer-associated thrombosis. *Blood cells mol. diseases* 36:177-181.
- [8] Prandoni P, Falanga A, Piccioli A (2005) Cancer and venous thromboembolism. *Lancet Oncol* 6:401-410.
- [9] Green K, Silverstein RL (1996) Hypercoagulability in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 10:499-530.
- [10] Medline plus (2005) Cervical cancer. <http://www.medlineplus.gov>. Cited 30 Jun 2005.
- [11] Janicek MF, Averette HE (2006) Cervical cancer: prevention, diagnosis and therapeutics. *CA cancer J Clin* 51:92-114.
- [12] Bennett JC, Plum, F. Cecil (1997) *Tratado de Medicina Interna*. 20^o ed vol.1. Guanabara Koogan.
- [13] Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P et al (2006) Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 367:489-498.

- [14] Wun T, Law L, Harvey D et al (2003) Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation and erythropoietin. *Cancer* 98:1514-1520.
- [15] Tateo S, Mereu L, Salamano S et al (2005) Ovarian cancer and venous thromboembolic risk. *Gynecol Oncol* 99:119-125.
- [16] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF et al (2003) Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 305:9-16.
- [17] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF et al (2001) Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:178-182.
- [18] Enjyoji K, Lin Y, Frenete PS et al (1999) Target disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 5:1010-1017.
- [19] Bakker WW, Poelstra K, Barradas MA et al (1994) Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 5:121-129.
- [20] Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2:409-430.
- [21] Dubyak GR (2002) Focus on extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 51:242-244.
- [22] Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K et al (2006) Ectonucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cell Mol Dis* 36:217-222.
- [23] Qawi I, Robson SC (2000) New developments in anti-platelet therapies: potential use of CD 39/ vascular ATP diphosphohydrolase in thrombotic disorders. *Current Drug Targets* 1:285-296.
- [24] Spychala J (2000) Tumor promoting functions of adenosine. *Pharmacol Theu* 87:161-173.

- [25] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F et al (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 109:189-194.
- [26] Araújo MC, Rocha JBT, Morsch A et al (2005) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochem Biophys Acta* 1740:421-426.
- [27] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS et al (1996) ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets* 7: 225–230.
- [28] Chan K, Delfert K, Junguer KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375-380.
- [29] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 218-254.
- [30] Benedet JL, Hacker NF, Ngam HYS (2003) FIGO Committe on Gynecologic Oncology. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers 1-160.
- [31] kasamatsu T, Okada S, Tsuda H et al (2002) Early invasive adenocarcinoma of the uterine cervix: criteria for nonradical surgical treatment. *Gynecol Oncol* 85:327-332.
- [32] Fimognari FL, Repetto L, Moro L et al (2005) Age, cancer and the risk of venous thromboembolism. *Crit Rev Oncol Hematol* 55:207-212.
- [33] Park HS, Hourani SMO (1999) Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5'-diphosphate (ADP) in human platelets. *Brit J Pharmacol* 127:1359-1366.
- [34] Prandoni P, Piccioli A, Girolami A (1999) Cancer and venous thromboembolism: an overview. *Haematologica* 84:437-445.
- [35] Haskó G, Cronstein BN (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25:33-39.
- [36] Hunsuckera SA, Mitchella BS, Spychala J (2005) The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Theu* 107:1-30.
- [37] Borowieck A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K et al (2006) Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol* (in press).

- [38] Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F et al (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Theu* (in press).
- [39] Munson L, Upadhyaya NB, Meter SV (1995) Platelet-derived growth factor promotes endometrial epithelial cell proliferation. *Am J Obstet Gynecol* 1820-1825.
- [40] Hernandez E, Lavine M, Dunton CJ et al (1992) Poor prognostic associated with thrombocytosis in patients with cervical cancer. *Cancer* 69:2975-2977.
- [41] Rapaport S.I (1990) *Hematologia*, Cap. 29, pag. 426-440. Ed. ROCA.

Legends:

Fig.1. ATP hydrolysis from patients treated with conization surgery (A). Group I (n=10) patients treated one year earlier until five years, Group II (n=10) patients recently treated (until three months earlier). ATP hydrolysis from patients treated with RTX (B). Group III (n=9) with women treated one year earlier until five years, Group IV (n=9) consisted of women recently treated (until three months earlier). (a) Significantly decreased when compared to the other groups. The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Fig.2 ADP hydrolysis from patients treated with conization surgery (A). Group I (n=10) patients treated one year earlier until five years, Group II (n=10) patients recently treated (until three months earlier). ADP hydrolysis from patients treated with RTX (B). Group III (n=7) patients treated one year earlier until five years, Group IV (n=7) patients recently treated (until three months earlier). (a) Significantly decreased when compared to the other groups. The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Fig.3 AMP hydrolysis from patients treated with conization surgery (A). Group I (n=11) patients treated one year earlier until five years, Group II (n=11) patients recently treated (until three months earlier). AMP hydrolysis from patients treated with RTX (B). Group III (n=7) patients treated one year earlier until five years, Group IV (n=7) patients recently treated (until three months earlier). (a) Significantly decreased when compared to the other groups. (b) Significantly decreased when compared to the control group and (c) significantly decreased when compared to the control and increased related to group IV. The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Fig.4 AMP hydrolysis comparison by test-t, in conization (Group II) and radiotherapy (Group IV) recently treated groups. Conization (n=10) and radiotherapy (n=10). (d) Significantly decreased related to the conization group. The results are expressed as mean \pm standard deviation.

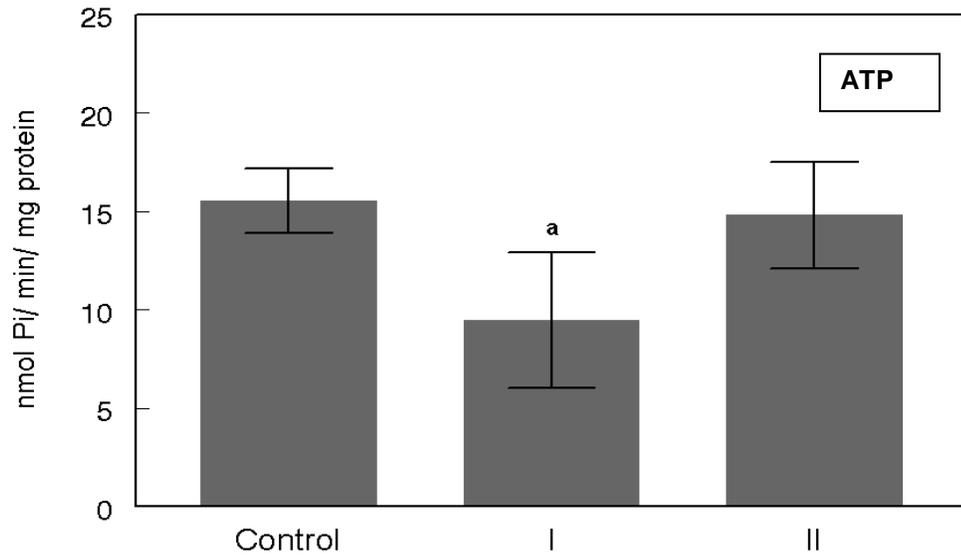


Fig. 1A

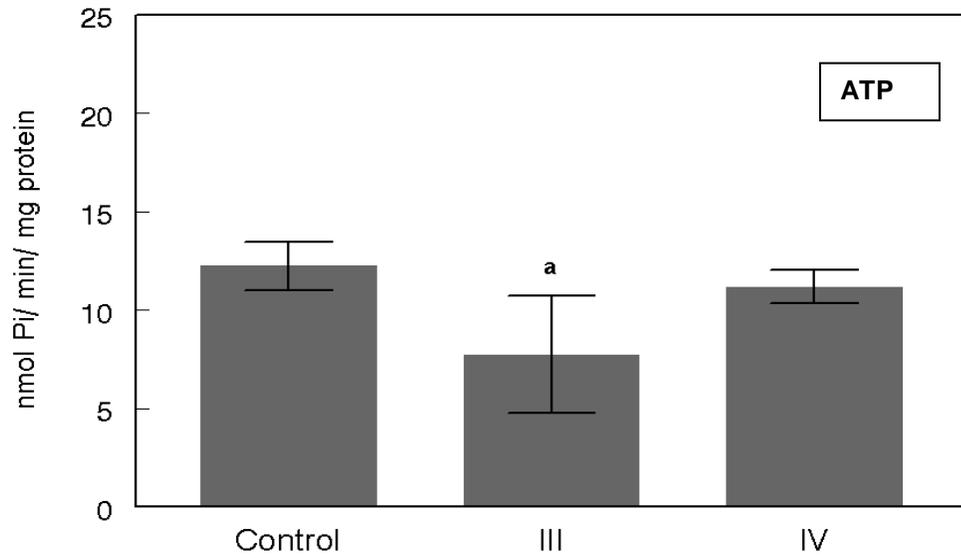
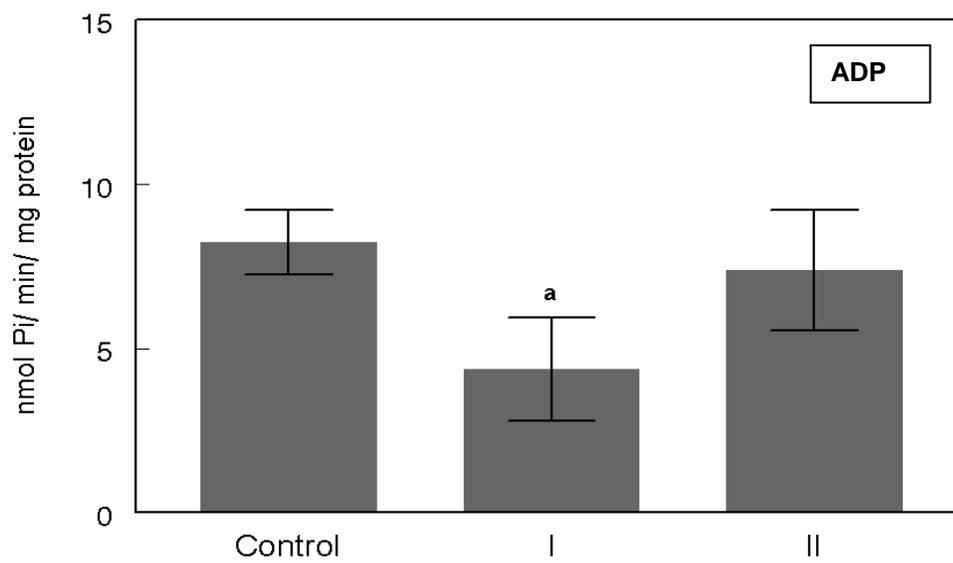
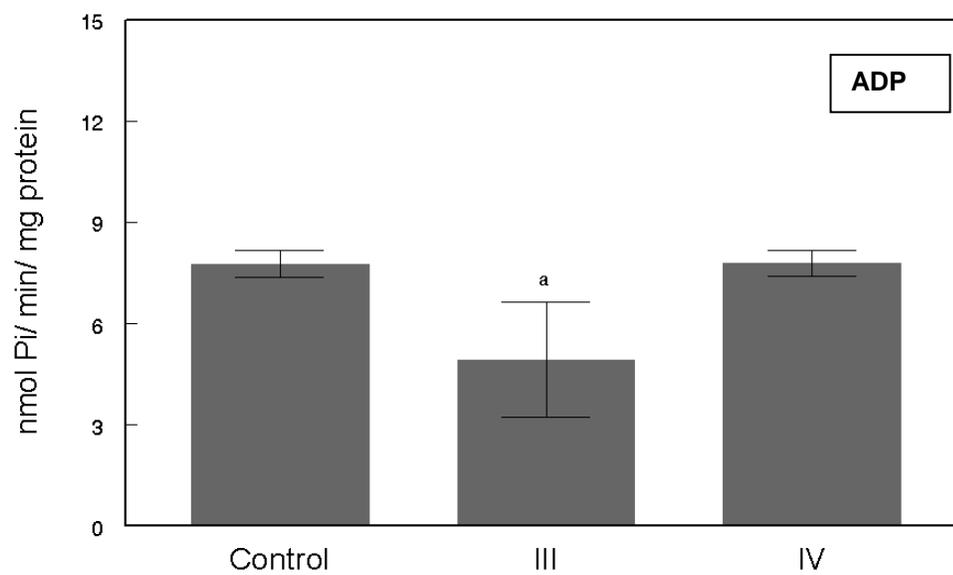


Fig. 1B

**Fig. 2A****Fig. 2B**

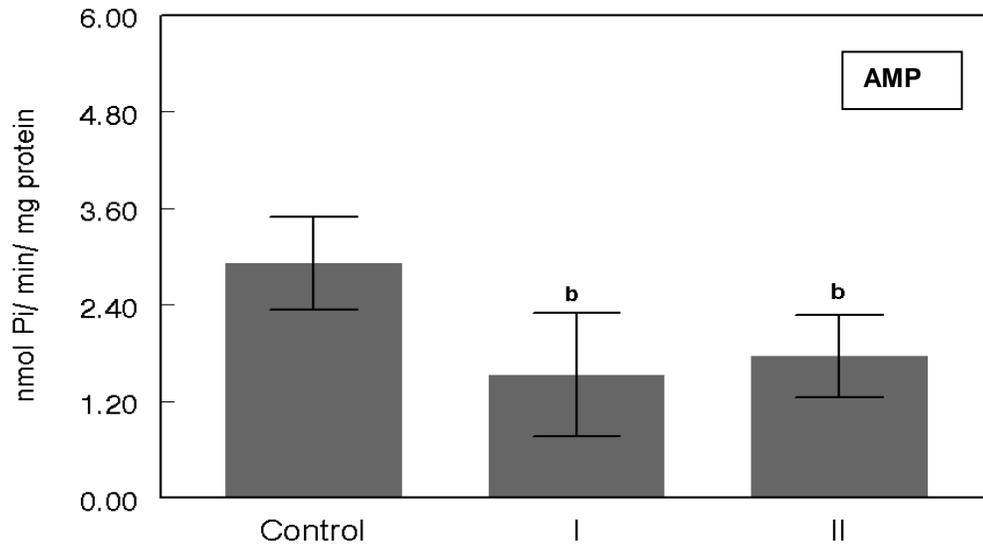


Fig. 3A

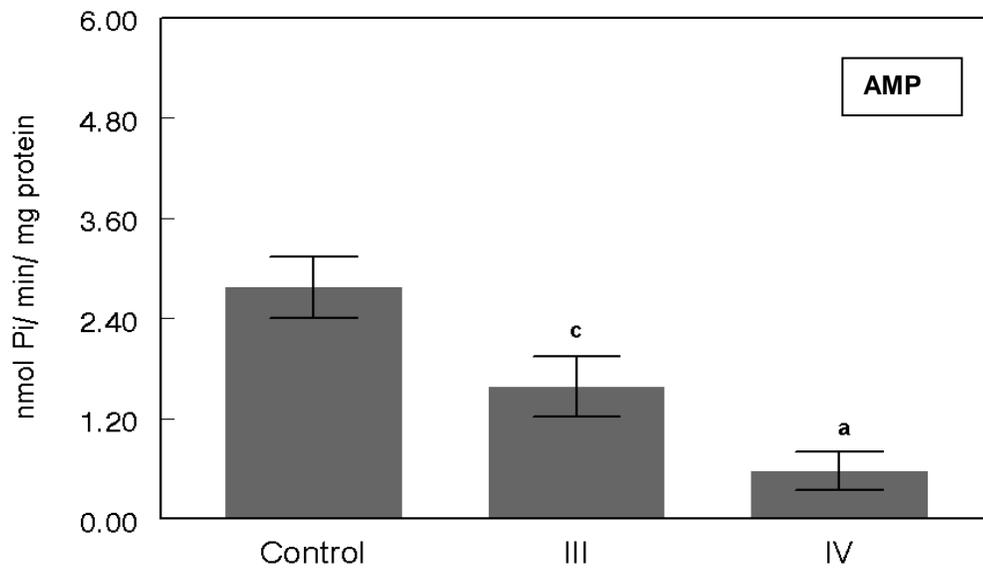


Fig. 3B

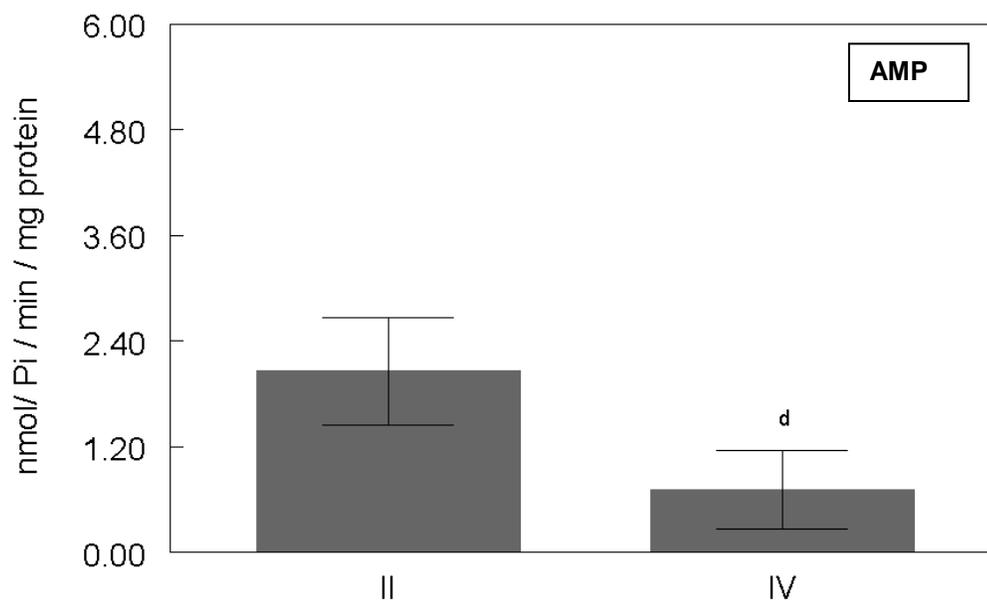


Fig. 4

Table 1. General classification of the patients

General characteristics			
Treatment modalities	Control	Conization	Radiotherapy
Stage of the disease	-----	HGSIL	HGSIL
Age range	25-65	25-54	38-67
N*	30	27	23

High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (HGSIL) which corresponds to the stage of the disease before the treatment.

*N, number of patients included in each group

Table 2. Partial Thromboplastin (APTT) and prothrombin (PT) times, platelets, white blood cells and hematocrit count and cytology screening

	Conization	Radiotherapy
APTT	29.83(11)	30.57 (8)
PT	85.84 (8)	86.43 (8)
Platelets count		
Medium	230(12)	241.22 (9)
Range (per mm ³)	158-285.000	171-360.000
White blood cell count		
Medium	7.814 (15)	6.835 (9)
Range (per mm ³)	4.700-9.800	3.600-9.600
Hematocrit (%)		
Medium	39.33 (16)	35.90 (10)
Range	36.1-42.63	31.3-42.04
Cytology screening after the end of the treatments*	Benign alterations compatible with normality	Benign alterations compatible with normality

Results are expressed as mean.

Parentheses contain the number of patients included in each determination.

APTT: Standard value was 25 seconds.

PT: Standard value was considered as 100% of activity.

* The examination was done when the patients returned to the hospital to make sure that the treatments were effective, the number of cytological evaluations was according to each case and each treatment adopted.

Table 3. Platelet aggregation profile

Agonist	Groups				
	Control	I	II	III	IV
ADP 2.5 µM	83.8± 5.16	73.40±3.2 ^a	74.9±2.2 ^a	74.2±6.6 ^a	79.2±5.5
ADP 5 µM	87.3±2	72.6±4.66 ^a	74.7±2 ^a	75±12.3 ^a	80.1±2
ADP 7.5 µM	81.8±3.8	74.8±4.9 ^a	74.4±2.8 ^a	74.2±3.4 ^a	81±2.4
Collagen 2 µg/ml	82.4±3.5	72.6±5.1 ^a	72.2±8.1 ^a	72.4±6.76 ^a	79.9±4
Collagen 5 µg/ml	81±3.5	74.6±3.9	78.5±7.2	74.1±5.7	78.4±1.2
Collagen 7.5 µg/ml	78.2±3.7	73±2.34	75.8±3.4	72.6±3.2	77.9±3

Results are expressed as percentage of aggregation.

^a significantly reduced related to control and non-treated groups.

^b significantly increased related to all the other groups.

7.3- Artigo 3:

Atividades da Ecto-nuceotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e da adenosina deaminase (ADA) em pacientes com neoplasia cervical uterina

**ECTO-NUCLEOSIDE PIROPHOSPHATASE/ PHOSPHODIESTERASE
(E-NPP) AND ADENOSINE DEAMINASE (ADA) ACTIVITIES IN
PATIENTS WITH UTERINE CERVIX NEOPLASIA**

Paula Acosta Maldonado, Maísa de Carvalho Corrêa, Lara Vargas Becker, Clóvis Flores,
Maria Beatriz Moretto, Vera Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger.



Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia[☆]

Paula Acosta Maldonado^a, Maísa de Carvalho Corrêa^a, Lara Vargas Becker^a, Clóvis Flores^b,
 Maria Beatriz Moretto^a, Vera Morsch^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a,*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^b Ambulatório de Ginecologia, Hospital Universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Received 11 September 2007; received in revised form 26 November 2007; accepted 25 December 2007

Available online 11 January 2008

Abstract

Objective: Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities, in the platelets and serum, were examined in patients with uterine cervix neoplasia without treatment as well as in patients treated by coization or radiotherapy (RTX).

Design and methods: The patients were divided based on the amount of time from the end of the treatments until the day of the blood sampling. Groups I ($n=19$) (coization) and III ($n=11$) (radiotherapy) (treated from one to five years earlier), groups II ($n=19$) (coization) and IV ($n=16$) (radiotherapy) (treated recently; up to three months earlier) and the non-treated group (cancer) ($n=7$).

Results: E-NPP and ADA in the platelets and E-NPP in the serum were decreased in all the treated groups in relation to the control and non-treated groups, while ADA in the serum was decreased only in the coization groups in relation to them. In group II, E-NPP and ADA, in the platelets, were increased in relation to group IV.

Conclusion: The tendency of reduction for E-NPP and ADA indicates that they may act together to control nucleotide levels and it may also be speculated that surgery causes greater platelet activation contributing to the changes seen in the coization groups. In this sense, platelets seem to be more sensitive than serum.

© 2008 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase; Adenosine deaminase; Cancer; Platelets; Serum; Adenine nucleotides; Adenosine; Coization; Radiotherapy

Introduction

Extracellular adenine nucleotides display a multiplicity of tissue functions including development, blood flow, secretion, inflammation and thromboregulation [1]. ATP and ADP are present in erythrocytes, platelets as well as in other cells and tissues. Platelets possess dense granules from which they release both ATP and ADP. Since these nucleotides are present in the extracellular medium, they may contribute to the alteration of platelet aggregation [2].

ATP, in low concentrations, enhances collagen, thromboxane A_2 and thrombin induced platelet aggregation [3]. At high concentrations, it inhibits platelet aggregation induced by ADP, probably because ATP is rapidly hydrolyzed to adenosine, which demonstrates inhibitory platelet action [4]. ADP is known to induce platelet aggregation, shape change, increase in cytosolic calcium and inhibition of activated adenylate cyclase [5].

Adenosine, which is a metabolite of adenine nucleotides, displays functions that will depend on the type of receptor in each tissue and on the origin of the damage, one important action being the reduction of vascular injury by platelet aggregation inhibition [6]. Adenosine also presents immunosuppressive and tumor promoting functions. Immunosuppressive functions include inhibition of cytokine release, adhesion of immune cells and functioning of cytotoxic lymphocytes. Tumor promoting functions are a result of the fact that it facilitates the growth

[☆] Category of submission: Original research communication- clinical investigation.

* Corresponding author.

E-mail addresses: maisschetinger@gmail.com, mariorosa@emil.ufsm.br (M.R. Chitolina Schetinger).

of certain tumors by stimulating angiogenesis, cytoprotection and by reducing hypoxia through vasodilatation [7].

Control of circulating nucleotide levels is important in the maintenance of the physiological nucleotide-mediated signaling process. This control is exerted by a family of enzymes that hydrolyzes them and consequently generates their respective metabolites [6].

These ecto-enzymes include the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (Ecto-NTPDase) and ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) families as well as 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA).

ENPPs (EC 3.1.4.1) are responsible for hydrolyzing 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives, where both purines and pyrimidines serve as substrates, resulting in production of nucleotides monophosphate [8,9]. This enzyme comprehends 3 members (NPP1-3), which are responsible for the conversion of cyclic AMP to AMP, ATP to AMP and ADP to AMP [10].

Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases represent a family of ubiquitous and conserved eukaryotic proteins that are either expressed as transmembrane ecto-enzymes or as secreted proteins [11–13]. As a result of the fact that their catalytic site is extracellular, this family of proteins is denoted as ecto-NPPs (E-NPP).

Adenosine deaminase (E.C. 3.5.4.4) catalyses the deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine. ADA itself has been used as a marker of malignancy. It is involved in controlling adenosine levels leading to inosine production and has been demonstrated to be modified by many pathological situations. For example, this enzyme has been shown to be altered in the presence of certain tumors [7].

Cancer itself is responsible for alterations in blood cells as well as in many tissues and physiological mechanisms. The early detection of malignant diseases may prevent its progression and this is especially true when the carcinoma in question is uterine cancer [14].

Invasive cervical neoplasias are predicted by a long phase of pre-invasive disease, called cervical intra-epithelial lesions (CIN), which allows great opportunities for intervention using conservative methods to impede the disease's progression [15,16]. Conization is the standard treatment for high grade intra-epithelial lesions due to the fact that is very conservative and allows for future pregnancies. In early stages, cervical cancer is managed by surgery, leaving radiotherapy or chemotherapy to the early or advanced high risk stages. Radiotherapy is normally used for patients with medical contraindications for surgery [15].

The literature describes the relation between adenine nucleotides and cancer. One study demonstrated that ectonucleotidases are changed according to the stage of breast cancer [17]. It found an increase in hydrolysis for ATP and a decrease for ADP, possibly indicating that the augmented ADP concentration could contribute to platelet activation in patients with breast cancer.

Considering the fact that adenosine and adenine nucleotides play an important role in the physiology of cancer and both ADA and E-NPPs are altered in many physiological processes, we

aimed to investigate the role of these enzymes in the serum and platelets of patients with uterine cervix neoplasia, treated by conization or radiotherapy. The use of conization and radiotherapy as treatments made it possible to accompany alterations in E-NPP and ADA activities caused by different techniques: surgery and radiation, and the choice of different periods of time, since the treatments had ended, became possible to observe their efficiency related to the presence of residual neoplasia as well as the risk for thrombosis. Furthermore, for the first time ADA will be evaluated in the platelets, which are circulating cells and thus will reflect a broad variety of pathological situations.

Materials and methods

Selection of the patients

The patients included in this work were diagnosed for high grade squamous intra-epithelial lesion (HGSIL) at the Federal University of Santa Maria Hospital. All the diagnoses were made by the correct evaluation of each case and depending on this, procedures such as cervix biopsy, Papanicolaou smears and colposcopy were used, after which either conization or radiotherapy were chosen as the appropriate treatment.

The patients were grouped according to the amount of time from the end of treatment to the day of blood collection as follows: groups (I) and (II) treated by conization, groups (III) and (IV) treated by radiotherapy and the last group was composed of patients who received the diagnosis of HGSIL, and had not received any type of treatment at the time of blood collection. Patients from Group I ($n=19$) and Group III ($n=11$) had been treated between 1 and five years earlier; Patients from Group II ($n=19$) and Group IV ($n=16$) had been recently treated (up to three months earlier) and the last group was defined as cancer patients ($n=7$). The patients were attended at the same hospital during and after the entire treatment period. The control group was composed of 20 healthy women who had no malignant pathology, no history of smoking or pharmacological therapy, no alcoholism dependence and with an age range similar to the test groups.

The blood sample was collected in vacutainer citrated tubes and tubes without a coagulant system on the day that the women returned to the hospital to verify the effect of the treatment on the tumor's development. In the non-treated group (cancer group), the blood was collected after the malignancy was confirmed by appropriate techniques of diagnosis. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria under the number 126/2004, and all the patients and the controls gave written consent. The cytological screening was carried out by evaluating the patients at frequent intervals by cervical cytology (Papanicolaou smear), pelvic examination and colposcopy evaluation depending on each case.

The coagulation parameters, such as prothrombin (PT) and partial thromboplastin (APTT) times, were determined with a Coag-a-mate-MTX apparatus (Organon Teknica, Durham, NC, USA) and quantitative determinations of platelets (platelet's count) were obtained using a Coulter-STKS analyzer (Miami USA) (Table 1).

Table 1

Coagulation parameters

Groups	Age (years)	PT (100%)	APTT (2.5s)	Platelets count (200–400.000/mm ³)
Control	49.30	88.82±13.98	27.45±1.79	249.000±76.07
Control group I (19)	40.33	83.23±9.94	27.40±4.46	289.000±42.88
Control group II (19)	59.80	89.57±20.74	28.12±4.20	248.000±51.59
RTX group III (11)	57.57	86.09±10.66	28.50±2.29	264.670±46.04
RTX group IV (16)				

The results are expressed as mean±standard deviation.

The number of patients in each group is present besides each group, between parenthesis.

PT: Standard value was considered as 100% of activity.

APTT: Standard value was 25 s.

PT and APTT reference values are used as parameters, for healthy people, at the Federal University of Santa Maria Hospital.

Platelet isolation

The platelet rich plasma was prepared according to Pilla et al. [18], with the following minor modifications. In short, the blood

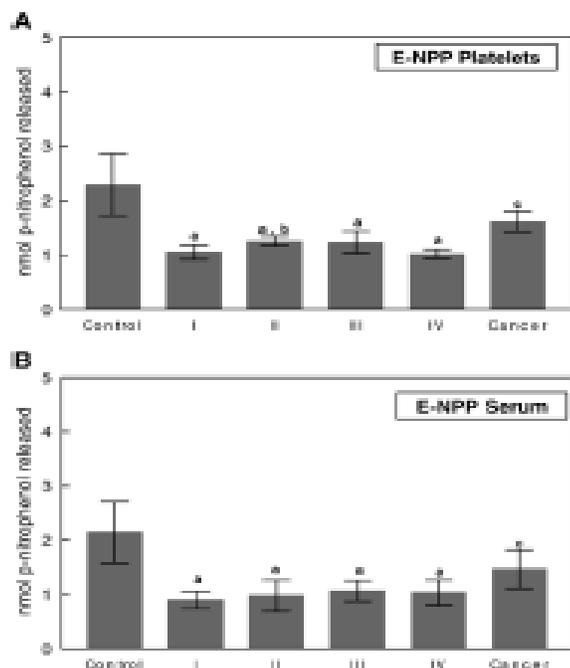


Fig. 1. (A) E-NPP activity in the platelets of patients treated with coization (I, II) or radiotherapy (III, IV) and cancer group. (*) Significant decrease in relation to control and cancer groups. (†) Significant increase in relation to group IV. (‡) Significant decrease in relation to control and increase in relation to the other groups. The results are expressed as mean±standard deviation. (B) E-NPP activity in the serum of patients treated with coization (I, II) or radiotherapy (III, IV) and cancer group. (*) Significant decrease in relation to control and cancer groups. (†) Significant decrease in relation to control and increase in relation to the other groups. The results are expressed as mean±standard deviation.

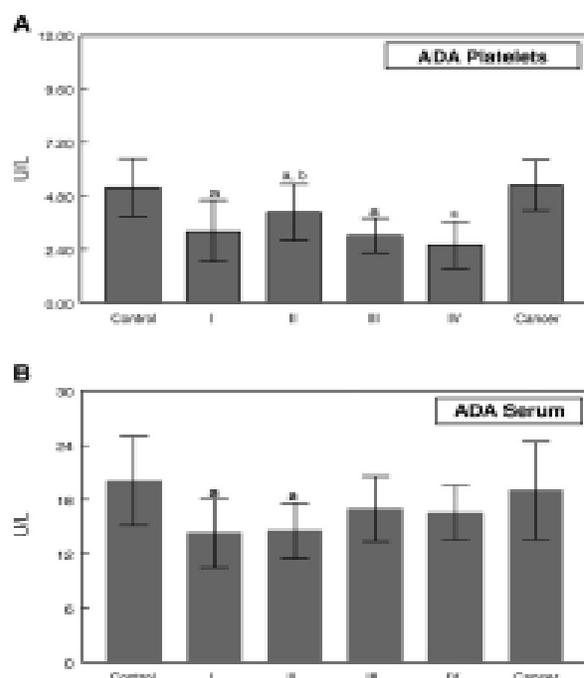


Fig. 2. (A) ADA activity in the platelets of patients treated with coization (I, II) or radiotherapy (III, IV) and patients from the cancer group. (*) Significant decrease in relation to control and cancer groups. (†) Significant increase in relation to group IV. The results are expressed as mean±standard deviation. (B) ADA activity in the serum of patients treated with coization (I, II) or radiotherapy (III, IV) and patients from the cancer group. (*) Significant decrease in relation to control and cancer groups. The results are expressed as mean±standard deviation.

was collected into 0.129 M citrated vacutainer tubes and centrifuged at 500 rpm for 10 min. After this, the platelet rich plasma was centrifuged at 3700 rpm for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, which contained 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine E-NPP and ADA activities.

Soon after separation of the platelets the cell viability was determined by measuring the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) present in the sample, using the labtest kit (Labtest, Lagoa Santa MG, Brasil). The procedure was repeated before and after the incubation period and samples with more than 5% of disrupted cells were excluded.

Exo-NPP activity determination—measurement of *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis in platelets and serum

The ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity, from platelets, was assessed using *p*-nitrobenzyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. [19]. The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 5.0 mM CaCl₂, pH 8.9, was preincubated

with approximately 20 mg per tube of platelet protein for 10 min at 37 °C in a final volume of 200 mL.

The enzyme reaction was started by the addition of *p*-Nph-5'-TMP to a final concentration of 0.5 mM. After 80 min of incubation, 200 mL NaOH 0.2 N was added to the medium to stop the reaction. The amount of *p*-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of 18.8×10^{-3} /M/cm. The enzymatic reaction, for serum samples, was determined as described by Sakura et al. 1998 [20]. The reaction medium containing *p*-Nph-5'-TMP as substrate (at a final concentration of 0.5 mM) in 100 mM Tris-HCl PH 8,9 was incubated with 1 mg of serum protein at 37 °C for 5 min in a final volume of 200 mL and the reaction was stopped by 200 mL of NaOH 0.2 N. Controls to correct non-enzymatic substrate hydrolysis were performed by adding platelet preparations and serum after the reaction had been stopped with NaOH as described for platelets. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomol of *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein (nmol *p*-nitrophenol released/min/mg protein).

Adenosine deaminase determination

Adenosine deaminase (ADA), both in serum and platelets, was determined according to Guisti and Galanti [21]. Briefly, 50 mL of serum or platelets reacted with 21 nmol/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. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to between 0.7–0.9 mg/mL. This concentration was chosen after a pilot experiment in which we used several protein concentrations and this range gave the best results, compared with ADA activity found in the erythrocytes. 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.

Protein determination

Protein content was determined according to Bradford, 1976 [22], using bovine serum albumin as standard.

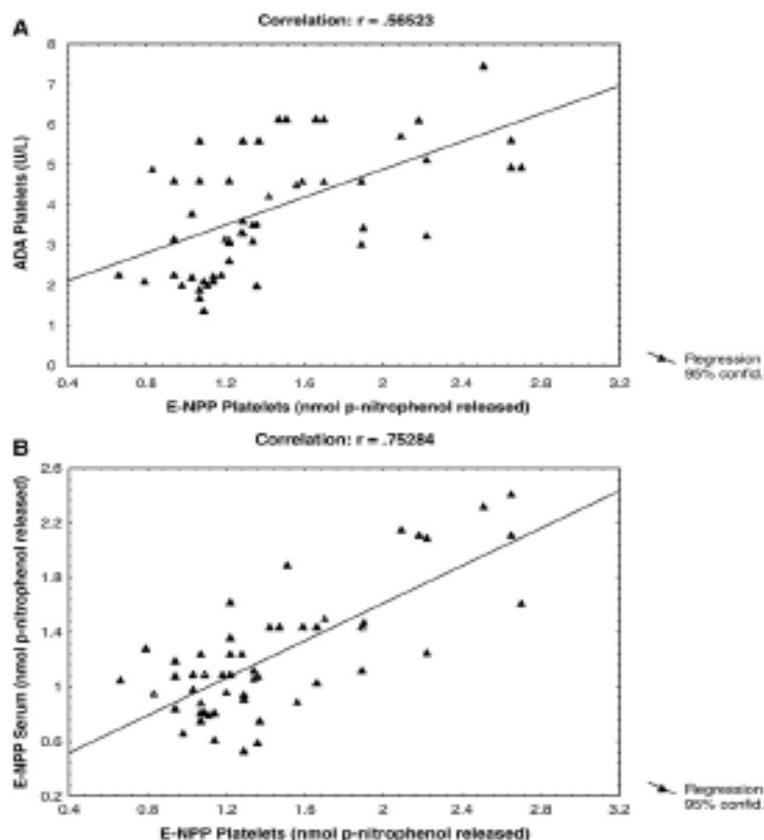


Fig. 3. (A) Pearson's correlation between ADA and E-NPP in the platelets ($p < 0.05$). (B) Pearson's correlation between E-NPP in the serum and E-NPP in the platelets ($p < 0.05$).

Statistical analysis

One way ANOVA followed by Duncan's *post-hoc* comparisons was carried out to evaluate the differences within each group of treatment. Correlation was evaluated by Pearson's test considering $p < 0.05$ significant.

Results

Cytological screening

No patient treated by conization or radiotherapy, developed recurrent neoplasia or any malignant or premalignant lesion of the lower genital tract. All cytopathological examinations revealed benign alterations compatible with normality. Margin examination revealed a negative result for invasive cancer as well as CIN.

Coagulation parameters

PT, APTT and the platelet count were not significantly changed in any group (Table 1).

Ecto-NPP and ADA activities in platelets and serum

The results described here are from one-way ANOVA followed by Duncan's *post-hoc* comparisons. LDH revealed that almost 4% of the platelets were disrupted indicating that the preparation was predominantly intact (data not shown).

E-NPP activity, from platelets and serum, was significantly decreased in all groups (I, II, III, IV) in relation to the control and non-treated groups (cancer), and the non-treated group was also significantly decreased in relation to the control. This activity was increased in the conization group II in relation to the RTX group IV, but only in the platelets (Figs. 1A and B) ($p < 0.05$).

ADA activity in the platelets was significantly decreased in groups I, II, III and IV in relation to the control and non-treated groups (cancer group). In the conization group II, ADA activity was significantly increased in relation to RTX group IV (Fig. 2A) ($p < 0.05$).

ADA activity in the serum was significantly decreased in conization groups I and II in relation to the control and non-treated groups (cancer). For the RTX treated groups, this activity in the serum was not significantly changed (Fig. 2B) ($p < 0.05$).

Analyzing the correlations, ADA and E-NPP demonstrated a positive correlation in the platelets (Fig. 3A) ($p < 0.05$). There was also a positive correlation between E-NPP in the platelets and in the serum (Fig. 3B) ($p < 0.05$).

Discussion

Although cervical cancer continues to be the second most frequent malignant disease in women [23], with the increase of Papanicolaou smear practice, it became possible to detect the disease in earlier stages and consequently it produced a significant reduction in incidence of this pathology [23].

Conization is usually the standard treatment for cervical intra-epithelial neoplasia (high grade-CIN 3). Apart from survival, treatment strategies depend on the benefits and disadvantages of each [24]. Clinical prognostic factors are useful in the selection of patients who should be treated primarily by radiation, leaving surgery for those who do not need adjuvant therapy [24].

The growth of the cancer depends on an appropriate vascular environment. The vascular environment of a tumor is usually inadequate, because the vessels are often too few in number and their caliber is not well established, which leads to inadequate blood supply. Consequently, in most solid tumors, the cells are hypoxic, causing adenine nucleotides breakdown culminating in adenosine generation [25].

The control of extracellular nucleotide concentrations is exerted by enzymes such as NTPDases, 5'-nucleotidase and E-NPP. Fürstenau et al. [19], proposed the co-localization of the E-NTPDase and E-NPP activities in intact platelets, which, together with 5'-nucleotidase, constitute a multiple system for extracellular nucleotide degradation.

Proliferating cells have a large requirement for purine and pyrimidine, which can be recycled from extracellular nucleotides through the action of both NTPDases and E-NPP as well as adenosine deaminase activities.

E-NPPs are frequently altered by pathological situations where their activity may become, together with other biological and clinical examinations, a useful tool for evaluating the disease progression. Such activity has been found to be increased in normal pregnancy [26], in some types of cancer and cholestatic liver disease [26,27]. In the present study, E-NPP and ADA evaluated in patients with uterine cervix neoplasia, were visibly altered by the treatments adopted. Our results demonstrate that E-NPP activity in the platelets and serum was significantly reduced for all the groups treated both by conization and radiotherapy in relation to control and non-treated patients (cancer group).

Considering the fact that E-NPP and ectonucleotidases constitute a multiple system for extracellular nucleotide hydrolysis [28], we may suggest that the inhibition of this activity, seen here, reflects a reduced degradation of the referred nucleotides. We may also propose that the tumor cells were arrested by the treatments, because as we know during tumor development the cells frequently present hypoxic conditions, which causes adenine nucleotide degradation [7]. Since we suppose that the tumor cells were arrested in all the treated groups, E-NPP activity is decreased as a function of the reduced nucleotide degradation in the absence of the tumor. As expected, in the patients who did not receive any previous treatment, this enzyme activity was enhanced, possibly as a consequence of the enhanced nucleotide degradation caused by the tumor presence, generating more AMP, which creates protection due its reversal actions compared to adenosine tumor promoting functions [29]. This suggestion is based on the properties of adenosine as a tumor facilitating agent, since this nucleoside causes induction of vasodilatation, neovascularogenesis and the reduction of hypoxia and inflammation [6,7]. However, the increase found in the cancer patients was not so pronounced that it exceeded the control values.

It is important to understand that this enzyme (E-NPP) presented the same pattern of alteration when two different samples were used. This was established by a positive correlation between serum E-NPP and E-NPP from platelets, possibly indicating that this enzyme does not undergo critical alterations when obtained from different sources.

Alterations in total ADA activity have been largely described in patients with malignant diseases, although the results are still contradictory. Some authors suggest that the rise in serum ADA levels in patients with malignancy are directly proportional to the primary tumor mass [28], while others have suggested that the less advanced the tumor, the higher the ADA activity is present [30]. Aghaei et al. [31] 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, with grade III carcinoma and the largest tumor size presenting the highest ADA activity.

The majority of the studies found in the literature evaluated ADA activity in the serum and cells such as lymphocytes, monocytes and erythrocytes, but none so far have determined cell surface ADA or ADA activity in the platelets. Our present study determined ADA activity in the platelets and serum of our patients so that we could evaluate whether the results are equivalent to E-NPP activity, as well as to determine whether the treatments adopted to treat uterine cervix neoplasia may influence these enzymatic activities.

The results found in this study revealed a decreased ADA activity in the platelets of all the groups treated by conization and radiotherapy in relation to the control and non-treated (cancer) patients. It may be explained because as we supposed before, for E-NPP, these patients do not present the tumor, as a result of the treatment applied, with this adenosine concentrations are decreased generating less substrate to ADA which in fact could contribute to the decreased activity of this enzyme.

The suggestion that conization and radiotherapy were effective, as treatments, in the elimination of tumor cells and the fact that the tumor was not detected after the treatments, as proposed for E-NPP, may also be applied for ADA. The prediction of the tumor's elimination was confirmed by cytological screening and margin examination, which demonstrated benign alterations allowing us to conclude negativity for malignancy. The value of the margin status as a predictor of the presence of neoplasia is in accordance with Chang et al. [32] who demonstrated that free cone margin may offer reassurance that invasive cancer is not present in the remaining cervix. The coagulation parameters provide additional evidence against the presence of multifocal invasion in the patients submitted to the treatments, because, as described by De Cicco [33], prolonged PT and APTT, which are demonstrated in cancer patients, did not occur in our study. The platelet count was also not significantly changed in these groups, further indicating that there were no abnormalities in the coagulation parameters, which is a phenomenon commonly seen in cancer patients.

As for E-NPP, the increased activity of ADA, in the non-treated group (cancer group), may be a result of the tumor presence, where this enzyme is acting in the degradation of adenosine, given that this nucleoside is present at high concentrations in tumor tissues.

As suggested by some authors, it is possible that the increased ADA activity function as a compensatory mechanism against the toxic accumulation of its substrates caused by accelerated purine and pyrimidine metabolism in cancer cells and tissues [34,35].

Considering ADA activity in the serum, we can see that only in the conization treated groups it was significantly reduced in relation to the control and non-treated groups. This was different from that seen in the platelets, where radiotherapy groups were also significantly changed, in spite of the fact that this group also presented a tendency toward a reduction.

Nishiham et al. [36] relate that the increased ADA activity, in tumors, comes back to values close to the controls after a successful removal of the tumors by surgery. The increased ADA activity, found by us, in the non-treated group (cancer), could also be explained because it may confer a selective advantage to cancer cells to grow and develop more rapidly, although the physiological significance is not completely understood. The increase seems to be a secondary phenomenon reflecting a salvage pathway activity of nucleic acid metabolism associated with tissue hyperproliferation [37]. Once more, the increase was not so pronounced in view of the fact that it was not significant in relation to control values.

As we demonstrated, ADA in the platelets appears to be more sensitive in terms of undergoing changes than it is in the serum, because in the platelets all the groups underwent significant alterations. We can also note that ADA follows the same pattern of alteration as E-NPP in the platelets, which was confirmed by a positive correlation established between them.

The proposal that surgery affects the activities of both enzymes more than radiotherapy, was confirmed because E-NPP and ADA activities in the platelets in group II (recently treated by conization) had a higher activity than did those in the group treated by radiotherapy (group IV), possibly in consequence of the recent surgical intervention. We may suggest that this occurs because surgery could activate the platelets causing the liberation of their granule content, which contains nucleotides such as ATP and ADP. As these nucleotides are present in the extracellular medium, they could cause an increase in E-NPP activity, which produces large amounts of AMP and at the end of ectonucleotidase's chain reaction it generates adenosine, through the activity of 5'-nucleotidase, causing the enhanced ADA activity in the presence of large amounts of its substrate.

Based on the results presented here we may suggest that conization and radiotherapy, both treatments applied for uterine cervix neoplasia, change E-NPP and ADA activities in a general inhibitory manner, and that surgery causes greater alterations in the enzymes when compared to radiotherapy. As we observed, patients treated long time ago had alterations in both enzymes but greater alterations were really seen in the comparisons done between the groups recently treated both by conization or radiotherapy. In addition, the platelets may better reflect physiological or pathophysiological changes than does the serum.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq, FAPERGS, CAPES and Federal University of Santa Maria Hospital.

References

- [1] Robson SC, Sévigny J, Zimmerman H. The E-NTFase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Paracrine Signal* 2006;2:409–30.
- [2] Bakker WW, Poelstra K, Barnard MA, Milhaudis DP. Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 1994;5:121–9.
- [3] Soslan G, Younggranikom D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1997;1355:131–40.
- [4] Birk AV, Brookman MJ, Gladek EM, et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J Lab Clin Med* 2002;140:166–75.
- [5] Paek H-S, Housni SMO. Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5'-diphosphate (ADP) in human platelets. *Br J Pharmacol* 1999;127:1359–66.
- [6] Baranowicz A, Lechowicz K, Tkacz-Sudnowska K, Skalski-Arciszewski AC. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol* 2006;53:269–78.
- [7] Szychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 2000;87:161–73.
- [8] Goding JW, Grobman B, Segers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 2003;1638:1–19.
- [9] Zimmerman H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001;52:44–56.
- [10] Cimpean A, Stefan C, Gibbers R, Stalmans W, Bollen M. Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. *Biochem J* 2004;381:71–7.
- [11] Bollen M, Gibbers R, Coolemans H, Stalmans W, Stefan C. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000;35:393–432.
- [12] Gibbers R, Coolemans H, Stalmans W, Bollen M. Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2001;276:1361–8.
- [13] Duan R-D, Bergman T, Xu N, et al. Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to nucleotide phosphodiesterase family. *J Biol Chem* 2003;278:38528–36.
- [14] Andrade, JM. Rastreamento, diagnóstico e tratamento do carcinoma do colo do útero. Projeto diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.
- [15] Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis and therapeutics. *CA Cancer J Clin* 2001;51:92–114.
- [16] An Introduction to Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN), assessed in 22/11/2006, available on www.iarc.fr.
- [17] Anaijo MC, Rocha JBT, Morsch A, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:421–6.
- [18] Pilla C, Ferrarelli T, Frassetto SS, Battistini AMO, Das R, Sarkis JIF. ATP diphosphohydrolase activity (ATPase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225–30.
- [19] Filastemma CR, Trentin DS, Barreto-chaves MLM, Sarkis JIF. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as a part of multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006;17:84–91.
- [20] Sakuma H, Nakashima A, Masuda M. Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb Res* 1993;91:83–9.
- [21] Guisti G, Galanti B. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim; 1984. p. 315–23.
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [23] Chi DS, Lanciano RM, Kudella AP. Cancer management: a multi-disciplinary approach. *Cervical Cancer* 5th ed. New York, NY: PRR, Inc. 2001.
- [24] Landoni F, Milano A, Colombo A, et al. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib–IIa cervical cancer. *Lancet* 1997;350:535–40.
- [25] Merighi S, Mirandola P, Vianini K, et al. A glance at adenosine receptors: novel target for anticancer therapy. *Pharmacol Ther* 2003;100:31–48.
- [26] Huang HF, Skrolek S. Nucleotide pyrophosphatase and phosphodiesterase I. Demonstration of activity in normal serum, and an increase in cholestatic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1976;11:121–7.
- [27] Hynie I, Maclellan M, Pomanski WJ. Determination of phosphodiesterase I activity in human blood serum. *Clin Chem* 1975;21:1383–7.
- [28] Lal H, Manjari SK, Wig U, Saini AS. Serum enzymes in head and neck cancer III. *J Laryngol Otol* 1987;101:1062–5.
- [29] Szychala J, Laczynski E, Ostapowicz A, et al. Role of estrogen in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;10:708–17.
- [30] Namiot Z, Stasiewicz J, Namiot A, Kenova A, Kralik M, Górski J. Adenosine deaminase activity in patients with intestinal type of gastric carcinoma. *Cancer Lett* 1996;109:199–202.
- [31] Aghaei M, Karimi-Tehrani F, Salemi S, Atri M. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: the assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. *Clin Biochem* 2005;38:887–91.
- [32] Chang D-Y, Cheng W-F, Tong P-L, Chen R-J, Huang S-C. Prediction of residual neoplasia based on histopathology and margin status of conization specimens. *Gynecol Oncol* 1996;63:53–6.
- [33] De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:187–96.
- [34] Donofrio J, Coleman MS, Hutton JJ, et al. Overproduction of adenosine deoxynucleosides and deoxynucleosine in adenosine deaminase deficiency with severe combined immunodeficiency disease. *J Clin Invest* 1978;62:884–7.
- [35] Hersfield MS, Kredich NM. Resistance of adenosine kinase deficient human lymphoblastoid cell line to effects of deoxynucleosine on growth. *5-adenosylhomocystein hydrolase inactivation and dATP accumulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:4292–6.
- [36] Nishihara H, Akedo H, Okada H, et al. Multienzyme patterns of serum adenosine deaminase by agar gel electrophoresis: an evaluation of the diagnostic value in lung cancer. *Clin Chim Acta* 2000;302:251–8.
- [37] Moss DW, Handerson AR. Enzymes. In: Burtis, Aswood ER., editor. *Tietz Fundamentals of clinical chemistry*. Philadelphia: WB: Saunders company; 1996. p. 297–300.

8. DISCUSSÃO

Esse trabalho avaliou os efeitos da conização e da RTX, ambos tratamentos usados nas pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical uterina de alto grau de origem escamosa (HGSIL), sobre os parâmetros oxidativos e sobre a degradação dos nucleotídeos de adenina na circulação. Paralelamente, foi avaliado se o efeito do tempo transcorrido após o término destes tratamentos poderia provocar algum efeito sobre os parâmetros citados.

Os resultados obtidos na avaliação de parâmetros oxidativos revelaram que os níveis de TBARS, proteína carbonil, catalase e GSH, encontraram-se elevados no grupo de pacientes com neoplasia o qual não havia sido tratado, em relação aos pacientes tratados por conização ou RTX e em relação ao grupo controle (artigo 1). O aumento dos oxidantes (TBARS, proteína carbonil) está de acordo com a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura, os quais relatam o aumento dessas espécies oxidantes na circulação de pacientes com câncer, possivelmente em consequência da aumentada produção de radicais livres pelo próprio tumor, que os lança na circulação (MILA-KIERZENKOWSKA et al., 2004; BEEVI et al., 2007). O aumentado nível de defesas antioxidantes pode ser em decorrência de estar no início da transformação neoplásica tumoral, sendo que o aumento destas defesas pode refletir uma tentativa de combater o excesso de radicais livres produzidos pelo tumor (MANJU et al., 2002; KIM et al., 2004). O fato dos tratamentos instituídos causarem um decréscimo nos parâmetros avaliados pode ser em decorrência da efetividade dos mesmos em combater as células tumorais, indicando a possível eliminação das mesmas e a consequente ausência do tumor.

Num segundo momento, foram avaliadas as atividades das enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos no meio extracelular (artigos 2 e 3). A avaliação da atividade da enzima NTPDase revelou uma reduzida hidrólise de nucleotídeos como o ATP e o ADP nos grupos tratados há mais tempo tanto por conização quanto por RTX, em relação ao grupo controle e aos grupos cujo o término dos tratamentos foi recente (artigo 2). A hidrólise reduzida do ATP poderia estar contribuindo para a redução na

formação do ADP e, em consequência, estas pacientes estariam protegidas contra a formação de trombos na circulação, uma vez que se sabe que o ADP pode provocar a ativação muitas vezes descontrolada de plaquetas e consequentemente desencadear o desenvolvimento de processos trombogênicos. Com menos ADP sendo formado, sua hidrólise também estaria reduzida. Esta redução na hidrólise dos dois nucleotídeos também poderia ser explicada pelo fato de que uma vez que os tratamentos tenham sido efetivos na cura da doença, a ausência de tumor não provocaria a degradação de nucleotídeos na circulação. Esta sugestão é baseada no fato de que muitas vezes determinados tumores podem provocar a degradação de nucleotídeos de adenina na circulação (SPYCHALA, 2000). No caso das pacientes cujo término dos tratamentos foi recente, o pequeno aumento da hidrólise de ambos os nucleotídeos, em relação aos grupos tratados há mais tempo, pode ser o reflexo de 2 tratamentos que podem ativar as plaquetas. O término recente destes tratamentos faz com que a NTPDase presente nas plaquetas esteja sujeita aos seus efeitos imediatos. Sabe-se que, tanto a RTX quanto a conização, podem provocar a ativação de plaquetas e fazer com que sejam liberados os conteúdos de seus grânulos, os quais contém ATP e ADP, que seriam então degradados pela NTPDase como um mecanismo protetor contra uma possível ativação de maneira descontrolada destas células provocada principalmente pelo ADP (artigo 2).

Com relação à atividade de hidrólise do AMP, pela ação da enzima 5'-nucleotidase, esta encontrou-se reduzida em todos os grupos tratados, tanto por conização ou RTX, em relação ao grupo controle, sugerindo que estes tratamentos foram efetivos em deter o desenvolvimento do tumor e consequentemente protegendo contra a produção de adenosina, a qual é um nucleosídeo presente em altas concentrações durante a progressão tumoral (SPYCHALA, 2000; BOROWIEC et al., 2006; BOURS et al., 2006). Comparando-se os dois tratamentos, verificamos que a RTX confere uma maior proteção contra a formação de adenosina do que o tratamento cirúrgico, uma vez que a hidrólise do AMP encontrou-se ligeiramente aumentada no grupo tratado recentemente por conização em relação ao grupo tratado recentemente por RTX, sugerindo que há uma produção de adenosina maior no grupo tratado cirurgicamente em relação ao grupo tratado por RTX. Isso poderia ser em decorrência

de que, uma vez que o processo cirúrgico pode ativar as plaquetas, um aumento na produção de adenosina poderia ser um mecanismo compensatório no intuito de que ocorra a vasodilatação e proteção contra a ativação descontrolada de plaquetas.

Seguindo esta linha, foi avaliada a atividade da enzima E-NPP em plaquetas e soro (artigo 3). A atividade da enzima de plaquetas estava reduzida em todos os grupos tratados por conização e RTX em relação ao grupo controle e ao grupo com neoplasia não-tratada. Esta inibição pode ser um reflexo da efetividade dos tratamentos aplicados, uma vez que quando não há tumor, não há degradação dos nucleotídeos de adenina, contribuindo para a decrescida atividade da enzima em questão. Esse resultado vem a ser confirmado pelo fato de que a atividade da enzima 5'-nucleotidase também está inibida em todos os grupos tratados. Esse achado demonstra a possível ligação entre essas duas enzimas, pois, uma vez que a atividade da E-NPP está inibida não há produção de substrato (AMP) para a 5'-nucleotidase.

Como esperado, no grupo com neoplasia não tratada, há um aumento na atividade da E-NPP, apenas em relação aos grupos tratados, possivelmente na tentativa de que, gerando mais nucleotídeos monofosfato estes poderiam servir como proteção contra a facilitação da progressão da doença, uma vez que reduziria a formação de adenosina, a qual é um facilitador da progressão tumoral. Esse fato também pode ser resultado do exposto anteriormente, de que em pacientes com câncer pode ocorrer a degradação de nucleotídeos de adenina, em razão de que muitas vezes esses pacientes podem apresentar pequenas situações de hipóxia. Embora ocorra este aumento em relação aos grupos tratados ele não se mostrou tão pronunciado de maneira a exceder os valores do grupo controle.

Novamente pode-se sugerir que a RTX teve um maior desempenho em prevenir a formação de adenosina do que a conização, pois com a atividade reduzida da enzima E-NPP no grupo tratado recentemente por RTX em relação ao mesmo grupo tratado por conização, forma-se menos AMP, refletindo-se na reduzida atividade da enzima 5'-nucleotidase, neste grupo, contribuindo para uma redução na concentração de adenosina. O pequeno aumento da produção de adenosina induzido pelo processo cirúrgico pode ser explicado possivelmente porque este tratamento teria um maior potencial de ativar plaquetas provocando a liberação do conteúdo de seus grânulos, o

qual inclui nucleotídeos como o ATP e o ADP. Esses nucleotídeos podem sofrer hidrólise tanto pela NTPDase quanto pela E-NPP e, com isso, haveria uma maior produção de AMP, o que seria responsável pelo aumento na atividade da 5'-nucleotidase observado neste grupo.

A E-NPP de soro seguiu a mesma linha de atividade da enzima plaquetária, porém não houve alteração significativa entre os grupos tratados recentemente por conização e RTX.

A atividade da enzima ADA de plaquetas, da mesma forma que para a E-NPP, estava reduzida em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle e ao grupo com neoplasia não tratada. Esta redução pode ser em decorrência da ausência do tumor, pela eficácia dos tratamentos, o que levaria a baixas concentrações de adenosina que é o substrato da enzima em questão. A atividade aumentada encontrada no grupo com neoplasia não tratada pode ser explicada pelo fato da presença do tumor estar gerando grande quantidade de adenosina, o que elevaria a atividade da ADA, uma vez que esta enzima é ativada pela alta concentração de adenosina. Essa elevação também poderia funcionar como uma tentativa de eliminar a maior parte deste nucleosídeo, como forma de proteção contra os efeitos promotores de tumor da adenosina. Novamente esse aumento não foi tão evidente de forma a exceder os valores do grupo controle.

Já a atividade da ADA em soro, somente nos grupos tratados cirurgicamente houve uma redução nessa atividade enzimática, em relação aos grupos controle e não-tratado. Essa redução apenas no grupo tratado cirurgicamente pode indicar que a enzima em soro é menos sensível que a enzima presente em plaquetas, tornando esta última amostra mais sensível a mudanças ou, mesmo que não haja alteração significativa na atividade total da ADA, no caso do grupo tratado por RTX, isso não quer dizer que suas isoenzimas não possam estar alteradas também. NISHIHARA e colaboradores (1970), também descreveram que o aumento encontrado na atividade da ADA, na presença do câncer, tende a voltar aos níveis próximos do controle após a remoção cirúrgica do tumor.

Tanto a atividade da enzima E-NPP, da 5'-nucleotidase e da ADA foram inibidas pelos tratamentos (artigos 2 e 3). Verificou-se que o tratamento cirúrgico (conização)

provocou alterações mais pronunciadas do que a RTX. Propõe-se que essas enzimas, de plaquetas, são mais afetadas pela cirurgia do que pela RTX, uma vez que os grupos recentemente tratados por conização tiveram uma maior atividade destas enzimas do que os grupos recém tratados por RTX. Isto pode ser reflexo da cirurgia “per se” a qual poderia provocar ativação plaquetária e liberação do conteúdo de seus grânulos, como ATP e ADP que provocariam ativação das enzimas em questão.

A proposta de que os tratamentos foram efetivos em combater as células tumorais é embasada no fato de que o exame citopatológico, pós-tratamento, demonstrou apenas alterações compatíveis com a normalidade, bem como o exame das margens do produto da conização não revelou a presença de neoplasia residual, pelo menos no período de tempo em que realizamos a coleta das amostras sanguíneas. Deve-se levar em consideração o fato de que os exames citopatológico e o exame das margens do produto da conização têm um grande valor em termos de predição da presença de neoplasia residual, sendo que pacientes com as margens do cone positivas, para a presença de células malignas, têm maiores chances de apresentar neoplasia residual do que aquelas com margens negativas (CHANG et al., 1996).

Levando em consideração que pacientes com câncer tem predisposição a desenvolver trombose e que esta tanto pode preceder quanto acompanhar o diagnóstico do câncer (PRANDONI et al., 1999; DE CICCIO, 2004; PRANDONI et al., 2005) foi realizada a avaliação de parâmetros coagulatórios como TP, TTP e a contagem de plaquetas, os quais não demonstraram nenhum tipo de alteração significativa (artigos 2 e 3), reforçando a afirmativa da ausência de células tumorais residuais pós- tratamento. Em relação à agregação plaquetária, os resultados ajudam a corroborar a sugestão de que ambos os tratamentos foram efetivos no combate as células tumorais uma vez que a agregação induzida pelo ADP, em todas as concentrações, e pelo colágeno, na concentração mais baixa, estava reduzida em todos os grupos tratados, indicando possivelmente que as plaquetas não se encontravam ativadas, em razão da ausência das células tumorais. É possível que os efeitos da RTX, sobre a ativação plaquetária, só sejam identificados em um curto período de tempo pós-tratamentos, por isso o grupo tratado por RTX recentemente (até três meses antes da

coleta) não apresentou resultados significativos, embora ocorra uma tendência a um pequeno aumento da agregação nesse grupo. É possível também que o colágeno induza a agregação plaquetária até atingir um determinado limite e a partir deste limite mesmo com o aumento da concentração do agonista não ocorra alteração da agregação plaquetária.

Tomando em conjunto os resultados dos artigos 2 e 3 observa-se que o processo cirúrgico (conização) afeta as atividades das enzimas E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA, plaquetárias, mais do que a RTX. Isso é observado pela atividade aumentada destas enzimas no grupo tratado recentemente por conização em relação ao mesmo grupo tratado por RTX. O aumento na atividade da E-NPP neste grupo, faz com que seja formada uma maior quantidade de AMP o que poderia contribuir para o aumento na atividade da enzima 5'-nucleotidase observada nesse grupo. Com isso, há um aumento na produção de adenosina, pela atividade da 5'-nucleotidase, o que poderia estar ativando a ADA para controlar a produção deste nucleosídeo na circulação. Em resumo, no que diz respeito às alterações plaquetárias que possam induzir alterações nas enzimas presentes em sua superfície, pode-se sugerir que o tratamento cirúrgico causa maiores alterações quando comparado a RTX.

Em termos dos possíveis efeitos do tempo transcorrido pós-término dos tratamentos nas atividades da ectoenzimas plaquetárias, podemos sugerir que a NTPDase sofre um maior efeito deste fator pelo fato de que houve uma distinção nas atividades desta enzima entre os 2 grupos tratados por conização e entre os 2 grupos tratados por RTX, diferentemente da E-NPP, da 5'-nucleotidase e da ADA, onde não observamos alterações específicas relacionadas ao fator tempo entre os grupos tratados pelo mesmo procedimento.

Sendo assim, foi constatado com esse estudo que existe uma grande associação entre as enzimas E-NPP, 5'-nucleotidase e ADA, uma vez que a atividade de cada uma delas parece ter grande influência direta sobre a atividade das demais. Já a enzima NTPDase parece ser bem mais sensível a mudanças nas concentrações dos nucleotídeos na circulação, tanto no que diz respeito a realização de dois tratamentos tão diferentes como também à espaços de tempo diferenciados. Isso se deve ao fato de que a NTPDase foi a única enzima que demonstrou-se alterada quando foram

comparados os diferentes tempos pós-tratamentos dentro do mesmo tipo de tratamento.

Em resumo pode-se dizer que, de uma maneira geral, as ectoenzimas representam uma cadeia enzimática responsável pela hidrólise destes nucleotídeos no meio extracelular e que a atividade de cada uma desempenha certo grau de influência sobre as demais.

9. CONCLUSÕES

Observando-se os resultados expostos anteriormente podemos sugerir que:

1. O aumento nos níveis de TBARS e proteína carbonil no grupo com neoplasia não-tratada em relação aos demais pode ser em consequência da própria célula tumoral estar produzindo espécies reativas e as lançando na circulação. O aumento observado nas defesas antioxidantes, nesse mesmo grupo, poderia ser explicado pelo fato destas defesas estarem atuantes no combate ao excesso de radicais livres durante o início da transformação neoplásica tumoral. Os reduzidos níveis de oxidantes e antioxidantes na circulação das pacientes tratadas podem ser em decorrência do tempo passado pós-tratamentos o qual pode ter contribuído para a melhora do balanço oxidante/antioxidante, ou mesmo a possível eficácia clínica das terapias aplicadas.
2. -Nos grupos com tratamentos finalizados há mais tempo, a NTPDase atua como uma proteção contra a formação de ADP, um poderoso agente pró-agregante. Já em pacientes com tratamentos finalizados recentemente a NTPDase protege contra a ativação descontrolada de plaquetas, pela aumentada hidrólise do ATP e do ADP. -A reduzida atividade da enzima 5'-nucleotidase em todos os grupos tratados, pode estar desempenhando um efeito protetor frente ao crescimento das células tumorais, uma vez que reduz a formação de adenosina. A RTX parece proporcionar uma maior proteção contra a formação de adenosina do que o tratamento cirúrgico, devido à reduzida hidrólise do AMP no grupo tratado recentemente por RTX em relação ao mesmo grupo tratado por conização. Essa redução na produção de adenosina poderia contribuir para a reduzida atividade da ADA plaquetária no mesmo grupo. A ADA sérica parece ser menos sensível a mudanças do que a enzima presente em plaquetas, uma vez que encontramos diferenças significativas somente para o grupo tratado por conização. Isso não descarta a hipótese de que esteja ocorrendo uma alteração apenas em um tipo de isoenzima sérica da ADA.

- A reduzida atividade, sérica e plaquetária, da enzima E-NPP, em todos os grupos tratados, poderia ser explicada baseado na efetividade destes tratamentos frente às células tumorais, o que pode levar a reduzida degradação destes nucleotídeos na circulação. A presença de neoplasia (de células tumorais) pode contribuir para a degradação de nucleotídeos na circulação, refletindo na aumentada atividade da E-NPP no grupo não-tratado.
 - A cirurgia (CNZ) afeta mais as enzimas como a E-NPP, a ADA e a 5'-nucleotidase plaquetárias do que a RTX, possivelmente por causar essa ativação plaquetária o que levaria a liberação do conteúdo granular (ATP e ADP) e a sua subsequente degradação, provocando o aumento nestas atividades enzimáticas observado nos grupos tratados recentemente por CNZ em relação aos tratados por RTX.
 - Pode-se sugerir também que a NTPDase demonstra-se mais sensível a mudanças frente ao tempo transcorrido pós-tratamentos do que as demais enzimas, uma vez que houve diferenças significativas na atividade da NTPDase entre os 2 grupos tratados por cone e entre os 2 grupos tratados por RTX.
3. Os parâmetros de coagulação (TP, TTP e contagem plaquetária) não sofreram nenhuma alteração condizente com a possível suspeita de ativação de plaquetas, corroborando a sugestão da ausência de células tumorais pós-tratamentos. A redução da agregação plaquetária nos grupos tratados reafirma a sugestão da eficácia terapêutica, e o fato de que a RTX possa causar efeitos ativatórios detectáveis nestas células apenas num curto período de tempo.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAEI, M. et al. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: the assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. **Clin. Biochem.**, v.38, p.887-891, 2005.

AGTERESCH, H. J. et al. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**, v. 58, p. 211–232, 1999.

ANDRADE, J.M. Rastreamento, diagnóstico e tratamento do carcinoma do colo do útero. Projeto diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, p.1-18, 2001.

ARAUJO, M.C. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1740, p.421-426, 2005.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 36, p.217-222, 2006.

BAKKER, W.W. et al. Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v. 5, p.121-129,1994.

BARBERA, L.; THOMAS, G. Venous thromboembolism in cervical cancer. **Lancet Oncol.**, v.9, p.54-60, 2008.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. Oxidative decay of DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 19633–19636, 1997.

BEEVI, S.S; RASHEED, M.H.; GEETHA, A. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. **Clin. Chim. Acta**, v. 375, p. 119-123, 2007.

BENEDET, J.L.; HACKER, N.F.; NGAN, H.Y.S. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Reprinted from International Journal of Gynecology and Obstetrics, v.70, p.207-312, 2000.

BICK, R.L. Cancer-associated thrombosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p.109-111, 2003.

BOLLEN, M. et al. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p.393–432, 2000.

BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta. Biochim. Pol.**, v.53, p.269-278, 2006.

BOURS, M.J.L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v.112, p.358-404, 2006.

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

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

CASADO, A. et al. Superoxide dismutase and catalase blood levels in patients with malignant diseases. **Cancer Lett.**, v. 93, p. 187-192, 1995.

CHANG, D.Y. et al. Prediction of residual neoplasia based on histopathology and margin status of conization specimens. **Gynecol. Oncol.**, v. 63, p. 53–56, 1996.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, p. 949-962, 1999.

CLAGETT, G.P. et al. Prevention of venous thromboembolism. **Chest** , v.108, p. 312S–34S, 1995.

CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, v. 12, p.274–277, 1996.

COLGAN, S.P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signal.**, v.2, p.351-360, 2006.

COOK, J.A et al. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. **Sem. Rad. Oncol.**, v.14, p. 259-266, 2004.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin. Chim. Acta**, v. 329, p.23-38, 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends. Mol. Med.**, v. 9, p.169-176, 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J. Cell. Mol. Med.**, v.10, p.389-406, 2006.

DE CICCIO, M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v.50, p.187-196, 2004.

DENKO, N.C.; GIACCIA, A.J. Tumor hypoxia, the physiological link between Trousseau's syndrome (carcinoma-induced coagulopathy) and metastasis. **Cancer Res.**, v. 61, p. 795-798, 2001.

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

DOLINSKY, C. Cervical cancer: the basics. Disponível em: <http://www.oncolink.com>. Acesso em: agosto de 2002.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v.82, p.47-95, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, p.61-68, 1997.

FIMOGNARI, F.L. et al. Age, cancer and the risk of venous thromboembolism. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 55, p.207-212, 2005.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Prog. Neurobiol.**, v. 52, p. 283–294, 1997.

FRASSETTO, S.S.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. **Mol. Cell. Biochem.**, v.129, p.47-55, 1993.

FURIE, B; FURIE, B.C. Cancer-associated thrombosis. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 36, p.177-181, 2006.

FÜRSTENAU, C.R. et al. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as a part of multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v.17, p.84-91, 2006.

GODING, J.W.; HOWARD, M.C. Ecto-enzymes of lymphoid cells. **Immunol. Rev.**, v. 161, p. 5–10, 1998.

GODING, J.W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **J. Leukoc. Biol.**, vol. 67, p. 285-311, 2000.

GODING, J.W.; GROBBEN, B.; SLEGERS, H. Physiological and patophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1638, p.1-19, 2003.

GOUIN-THIBAUT, I.; SAMAMA, M. Laboratory diagnosis of the thrombophilic state in cancer patients. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 25, p. 167–172, 1999.

GUL, M. et al. Cellular and clinical implications of glutathione. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 38, p. 625-634, 2000.

GURGEL, M.S.C. et al. Microinvasive carcinoma of the uterine cervix: histological findings on cone specimens related to residual neoplasia on hysterectomy. **Gynecol. Oncol.**, v.65, p. 437-440, 1997.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v.35, p.1147-1150, 2007.

HANDA, M., GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 218, p. 916–923, 1996.

HASKÓ, G; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol.**, v.25, p.33-39, 2004.

HERNANDEZ, E. et al. The Significance of thrombocytosis in patients with locally advanced cervical carcinoma: A gynecologic oncology group study. **Gynecol. Oncol.**, v. 78, p.137–142, 2000.

HENSLEY, K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radic. Biol. Med.**, v.28, p.1456-1462, 2000.

HIRSCHHORN, R.; RATECH, H. Isozymes of adenosine deaminase. **Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.**, v.4, p.131-157,1980.

HUNSUCKER, S.A.; MITCHELL, B.S.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacol. Ther.**, v. 107, p.1– 30, 2005.

ICIEK, M. et al. Plasma levels of total, free and protein bound thiols as well as sulfane sulfur in different age groups of rats. **Acta Biochim. Pol.**, v. 51, p.815-824, 2004.

JACOBSON, G.M. et al. Thromboembolic events in patients treated with definitive chemotherapy and radiation therapy for invasive cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, v.96, p.470-474, 2005.

JADHAV, G.K.R. et al. Possible role of glutathione in predicting radiotherapy response of cervix cancer. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.41, p.3-5, 1998. Erratum in: **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.44, p.745, 1999.

JAMESON, L.J. et al. Harrison- Medicina Interna. 15^oed. Editora Mc Graw Hill, 2002.

JANICEK, M.F.; AVERETTE, H.E. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. **Cancer J. Clin.**, v.51, p.92-114, 2001.

JÚNIOR, J.F. Metabolismo das Células Cancerosas: A drástica queda do GSH e o aumento da oxidação intracelular provoca parada da proliferação celular maligna, aumento da apoptose e antiangiogênese tumoral. **Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar**. Disponível em [http:// www.medicinacomplementar.com.br](http://www.medicinacomplementar.com.br). Acesso em set. de 2004.

KARPATKIN, S; PEARLSTEIN, E. Role of platelets in tumor cell metastases. **Ann. Intern. Med.**, v. 95, p.636–641, 1981.

KIDD, P.M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Altern. Med. Review**, v. 2, p.155-176, 1997.

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

KLAUNIG, J.E., KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.44, p.239-267, 2004.

KOEHLER, L.H.; BENZ, E.J. Serum adenosine deaminase: methodology and clinical applications. **Clin. Chem.**, v. 8, p.133-40,1962.

KUMARAGURUPARAN, R. et al. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. **Clin. Chim. Acta**, v.325, p.165-170, 2002.

KUMARAGURUPARAN, R.; KABALIMOORTHY, J.; NAGINI, S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. **Clin. Biochem.**, v.38, p.154-158, 2005.

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

LEAL, D.B. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1746, p.129-134, 2005.

LEAL, C.A.M. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. **Mol. Cell. Biochem.**, v.304, p. 325-330, 2007.

LUNKES, G.I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb. Res.**, v.109, p.189-194, 2003.

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

LORENZI. Manual de Hematologia. 2^o ed., Ed.MEDSI, Rio de Janeiro,1999.

MANJU, V; SAILAJA, J.K.; NALINI, N. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. **Clin. Biochem.**, v. 35, p.621-625,2002.

MANOHARAN, S; KALANJIAPPAN, K; KAYALVIZHI, M. Enhanced lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 9, p.699-707, 2004.

MARCUS, A.J. et al. Metabollic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, p.9-16, 2003.

MATÉS, J.M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. **Front. Biosci.**, v.15, p. 339-345,1999.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GOMEZ, C., NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.**, v.32, p.595-603, 1999.

MERIGHI, S. et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. **Pharmacol. Ther.**, v.100, p.31-48, 2003.

MILA-KIERZENKOWSKA, C. et al. The effect of brachytherapy on antioxidant status and lipid peroxidation in patients with cancer of the uterine cervix. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 9, p.511-518, 2004.

MILOJKOVIC, M. Residual and recurrent lesions after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 76, p. 49-53, 2002.

MORGAN, M.A. et al. The clinical course of deep vein thrombosis in patients with gynecologic cancer. **Gynecol. Oncol.**, v.84, p.67-71, 2002.

MORRIS, M. et al. Cervical conization as definitive therapy for early invasive squamous carcinoma of the cervix. **Gynecol. Oncol.**, v. 51, p.193-196, 1993.

MOSS, D.W; HANDERSON, A.R. Enzymes. In:Tietz Fundamentals of clinical chemistry. (Eds. Burtis CA, Ashwood ER), Pp.297-300. Philadelphia:W.B. Saunders company, 1996.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: Human papillomavirus in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 4S3:S1-S10, p. 1-10, 2006.

MUNSON, L.; UPADHYAYA, N.B.; VAN METER, S. Platelet-derived growth factor promotes endometrial epithelial cell proliferation. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.173, p.1820-1825, 1995.

NISHIHARA, H. et al. Multienzyme patterns of serum adenosine deaminase by Agar gel electrophoresis: an evaluation of the diagnostic value in lung cancer. **Clin. Chim. Acta.** , v.30, p.251-258, 1970.

NOVAES, P.E.; ABRANTES, M.A.; VIEGAS, C.M.P. Câncer de colo uterino. Epidemiologia, etiopatogenia, diagnóstico e estadiamento clínico: Planejamento computadorizado. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>, p.39-65, 2006.

OTTEN, H-M.M.B.; PRINS M.H. Venous thromboembolism and occult malignancy. **Thromb. Res.**, v. 102, p.187-194, 2001.

- PARKIN, D.M. et al. Global cancer statistics, 2002. **Cancer J. Clin.**, v.55, p.74-108, 2005.
- PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225–230, 1996.
- PRANDONI, P; PICCIOLI, A; GIROLAMI, A. Cancer and venous thromboembolism: an overview. **Haematologica**, v.84, p.437-445, 1999.
- PRANDONI, P.; FALANGA, A.; PICCIOLI, A. Cancer and venous thromboembolism **Lancet Oncol.**, v.6, p. 401–10, 2005.
- QUINN, M. Cervix: chapter 6. Disponível em: <http://www.statistics.gov.uk>. Acesso em: 10 Out. 2007.
- RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. **Immunol. Rev.**, v.161, p.95–109, 1998.
- RILEY, P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 65, p. 27-33, 1994.
- RICH, W.M. Cancer of the uterus. Disponível em: <http://www.gynecancer.com>. Acesso em 29 Out. 2007.
- ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal.**, v. 2, p.409-430, 2006.
- SALGANIK, R.I. The Benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.20, p. 464-472, 2001.
- SANKARANARAYANAN, R. Overview of cervical cancer in the developing world. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v.95, p.205-210, 2006.
- SARKIS, J.J.F. et al. ATP diphosphohydrolases: an overview. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.47, p.131-136, 1995.
- SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in modulation of platelet aggregation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1355, p.131-140, 1997.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metab. Rev.**, v.32, p.307–326, 2000.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic. Biol. Med.**, vol 27, 916-921, 1999.

SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v.222, p.1-15, 1984.

SOVIC, A. et al. The carcinostatic and proapoptotic potential of 4-hydroxynonenal in HeLa cells is associated with its conjugation to cellular proteins. **Anticancer Res.**, v. 21, p. 1997-2004, 2001.

SPYCHALA, J. Tumor promoting functions of adenosine. **Pharmacol. Ther.**, v. 87, p.161-173, 2000.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 542-550, 2005.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signalling by NPP- type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signal.**, v.2, p.361-370, 2006

UNEGERER, J.P.J. et al. Serum adenosine deaminase : Isoenzymes and diagnostic application. **Clin. Chem.**, v.38, p. 1322-1326, 1992.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, p.1–40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 39, p.44-84, 2007.

VOLLMAYER, P. et al. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p.2971-2978, 2003.

What you need to know about cancer of the uterus. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em: <http://www.cancer.gov>. Acesso em jan., 2002.

www.health.nytimes.com. Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and pre-invasive cancer. Acesso em: jun., 2008.

www.iarc.gov. INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Introdução à neoplasia intraepitelial cervical (NIC).

www.inca.gov. Acesso em: 23 jun. 2008. INCA-Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil**.

www.medlineplus.gov. Acesso em: 30 Jun. 2005. Cervical cancer.

www.medlineplus.gov. Acesso em: 11 Out. 2007. Cervical cancer.

www.woodmed.com. Acesso em: 9 jan.2002. Glutathione (GSH). Woodlands healing research center.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1783, p.673-694, 2008.

YILDIRIM, Z. et al. Serum adenosine deaminase activities in lung cancer and mesothelioma. **Clin. Biochem.**, v.32, p.283-285, 1999.

ZALATAN, J.G. et al. Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: implications for mechanism and evolution. **Biochemistry**, v.45, p. 9788-9803, 2006.

ZHANG, Y. et al. Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells. **Carcinogenesis**, v. 23, p.207-211, 2002.

ZIEBA, M. et al. Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissues and pulmonary parenchyma. **Respir. Med.**, v. 94, p. 800-805, 2000.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 362, p. 299-309, 2000.

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

Perspectivas futuras:

Tendo em vista os valiosos resultados encontrados com esse trabalho, em que observamos duas vertentes tão importantes: como as alterações provocadas pelo tempo transcorrido pós-tratamentos e os efeitos de dois tratamentos tão diferentes tecnicamente. Em adição a isto, observamos 2 fortes correlações: radicais livres *versus* neoplasia cervical e ectoenzimas *versus* trombose e neoplasia cervical. Em razão de termos avaliado pacientes com neoplasias cervicais de alto grau e uma vez que, demonstramos resultados bastante surpreendentes temos como perspectivas avaliar também pacientes com neoplasias cervicais de baixo e médio grau, como também lançar mão de marcadores da expressão enzimática e marcadores tumorais (CA 125 e antígeno P53).