

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

**ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA
PURINÉRGICO E ANÁLISE DE BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO**

TESE DE DOUTORADO

Daniela Zanini

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA
PURINÉRGICO E ANÁLISE DE BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO**

Daniela Zanini

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

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

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

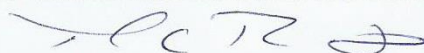
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E
ANÁLISE DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO**

elaborada por
Daniela Zanini

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

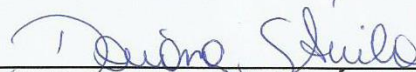
COMISSÃO EXAMINADORA:



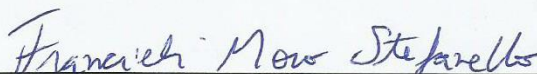
Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger
(Presidente/Orientador)



Prof.^a Dr.^a Charlene Cavalheiro de Menezes/UFSM



Prof.^a Dr.^a Daiana Silva de Ávila/Unipampa



Prof.^a Dr.^a Francieli Moro Stefanello/UFPEl



Prof.^a Dr.^a Nilda Berenice de Vargas Barbosa/UFSM

Santa Maria, 13 de novembro de 2014.

*Aos meus pais Dalamir e Cleonice,
A minha irmã Angela*

*Pelo apoio em todos os momentos, pelas palavras de conforto, por não
medirem esforços para me ajudar e estarem sempre ao meu lado,
minha eterna gratidão e todo meu carinho.
Vocês dão sentido a minha vida!
Amo-os!
Que Deus sempre abençoe nossa família!*

AGRADECIMENTOS

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

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

Um agradecimento especial a minha orientadora, Professora Maria Rosa, pela dedicação, atenção, compreensão e apoio. A vocês, Professoras Rosa e Vera, minha gratidão pela oportunidade que me deram de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pela possibilidade de crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

A minha co-orientadora Daniela Leal, pela oportunidade, atenção e toda ajuda dispensada. Obrigada por tudo, Professora Daniela!

Agradeço a minha família, meu pai Dalamir, minha mãe Cleonice e minha irmã Angela, por me apoiarem sempre, por tolerarem meus incômodos, por me confortarem nas horas difíceis, por torcerem pela minha felicidade e estarem ao meu lado em todos os momentos "...como é grande o meu amor por vocês!"

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

Aos membros da banca examinadora desta tese, professoras Charlene, Daiana, Francieli e Nilda, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o seu aprimoramento.

Agradeço a Beta e a Lú por estarem ao meu lado e torcerem por mim! Obrigada pela amizade e compreensão! Vocês são muito especiais!

Preciso agradecer infinitamente aos meus amigos e colegas do Laboratório de Enzimologia Toxicologia (Enzitox). A todos muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia.

À secretária do PPGBTox, Dica, pela atenção e disponibilidade de sempre.

Aos colegas do Hospital Militar da Guarnição de Alegrete, Victor, Luciana, Dona Ana, Ferreira, Emanuel e Dona Jussara pelos momentos maravilhosos de convivência, seja no trabalho ou no lazer. Vocês são muito especiais para mim! Obrigada por tudo (pelos mates na praça, pelos lanches fartos, pelas festas no Alegrete etc).

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

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

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

À CAPES, pela bolsa concedida.

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

O nosso Deus com amor sem medida
chamou-nos à vida, nos deu muitos dons.
Nossa resposta ao amor será feita, se a
nossa colheita mostrar frutos bons.

RESUMO

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

ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E ANÁLISE DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO

AUTORA: DANIELA ZANINI
ORIENTADORA: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER
CO-ORIENTADORA: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de novembro de 2014.

O câncer de pulmão tornou-se uma das doenças neoplásicas mais comumente diagnosticadas, além de uma das mais letais em todo o mundo, caracterizando-se, portanto, como um problema de saúde pública. Essa disseminação do câncer de pulmão na população mundial, que é claramente observada em dados estatísticos, está intimamente relacionada ao consumo de tabaco, sendo o tabagismo considerado um dos principais fatores de risco que levam ao desenvolvimento de câncer desde a década de 50. As pesquisas têm demonstrado que há uma estreita relação entre: *tabagismo - processos inflamatórios - eventos pró-trombóticos - câncer de pulmão*. Nesse contexto, torna-se importante a análise de biomarcadores de inflamação, já que sítios inflamados são ambientes propícios para o desenvolvimento de tumores, assim como o estudo da atividade das enzimas ectonucleotídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase, ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e ecto adenosina desaminase (E-ADA), que estão envolvidas na regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina amplamente envolvidos na inflamação e na agregação plaquetária. Trabalhos revelam que o estresse oxidativo está intimamente associado ao desenvolvimento e à progressão de neoplasias, razão pela qual torna-se extremamente relevante a avaliação desses aspectos das funções celulares em um grupo de pacientes com câncer de pulmão. Diante disso, os objetivos deste estudo foram: a) verificar os níveis séricos de citocinas como a IL-6, IL-17, IL-4, IL-2, IL-10, interferon- γ (INF- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF); b) avaliar a atividade da E-NTPDase, da E-NPP, da ecto-5'-nucleotidase e da E-ADA em plaquetas, bem como a agregação plaquetária; c) avaliar a atividade da δ -aminolevulínico desidratase (δ -ALA-D) eritrocitária, os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em plaquetas e de espécies reativas (ER) no soro; d) analisar o perfil antioxidante enzimático - através da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) em plaquetas - e o perfil antioxidante não enzimático - através do conteúdo de tióis totais (T-SH) e tióis não protéicos (NPSH) em plaquetas e dos níveis de vitamina C no plasma e de vitamina E no soro, em um grupo de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células, atendidos no setor de Hematologia/Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria. Quanto aos aspectos éticos, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) e está registrado sob o número: 0061.0.243.000-10. Os resultados encontrados demonstram que os pacientes com câncer de pulmão apresentaram um incremento nos níveis séricos de IL-6 os quais estão intimamente relacionados com o desenvolvimento e a progressão tumoral, visto que essa citocina apresenta atividade pró-inflamatória e pró-tumoral. Além disso, os níveis de IL-17 estão diminuídos nesses pacientes, o que pode estar relacionado com o estágio avançado de desenvolvimento do câncer de pulmão nos indivíduos estudados. Ademais, os pacientes com neoplasia pulmonar mostraram uma diminuição na atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ADP, fato que contribui para a ampliação dos efeitos pró-coagulantes comumente observados em pacientes com doenças neoplásicas. Essa hipótese é reforçada pelo aumento da agregação plaquetária observado quando ADP foi utilizado como agonista do processo. Os pacientes envolvidos nesse estudo apresentaram uma diminuição na expressão da CD39 em plaquetas, que está de acordo com o observado para a atividade da NTPDase nas mesmas. Ainda, os pacientes com câncer de pulmão tiveram um aumento na atividade da ecto-5'-nucleotidase e uma diminuição na atividade da E-ADA em plaquetas, sugerindo que os níveis extracelulares de adenosina estão elevados nos mesmos, proporcionando avanço no desenvolvimento tumoral tendo em vista as ações promotoras

de crescimento tumoral e de estímulo à angiogênese características da adenosina. Em relação ao perfil oxidativo, a atividade da enzima δ -ALA-D apresentou-se inibida em pacientes com câncer de pulmão, o que pode predizer a ocorrência de um quadro de estresse oxidativo nesses pacientes. Esse cenário pode ser confirmado pelos elevados níveis de TBARS e de ER verificados nos pacientes com neoplasia pulmonar. Essa superprodução de oxidantes também pode estar ocasionando a inibição das enzimas SOD e CAT nas plaquetas e, desse modo, a função e a estrutura das mesmas pode estar comprometida. Além disso, houve uma diminuição nos níveis de importantes antioxidantes não enzimáticos nos pacientes com câncer de pulmão, mostrando que suas ações benéficas podem estar sendo exercidas de modo insuficiente. Por outro lado, os níveis elevados de T-SH e, possivelmente, da glutatona, estariam implicados no desenvolvimento de resistência tumoral à quimioterapia. Portanto, os resultados aqui descritos sugerem que o câncer de pulmão exerce uma importante alteração nos níveis séricos de IL-6 e IL-17, na atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas, bem como no perfil oxidativo desses pacientes, podendo os parâmetros mencionados nesta pesquisa serem úteis na clínica médica, para o monitoramento da patologia. Espera-se, assim, que esse trabalho possa ter contribuído para o melhor entendimento do papel do sistema purinérgico e dos biomarcadores de processos inflamatórios e de estresse oxidativo na fisiopatologia do câncer de pulmão.

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

ABSTRACT

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

PURINERGIC ECTOENZYMES ACTIVITY AND ANALYSIS OF INFLAMMATORY AND OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN PATIENTS WITH LUNG CANCER

AUTHOR: DANIELA ZANINI
ADVISER: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER
CO-ADVISER: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL
Date and Place of the Defense: Santa Maria, November 13th, 2014.

Lung cancer has been considered a public health problem since it has become one of the most commonly diagnosed neoplastic diseases and one of the most lethal in the world. This spread of lung cancer in the world population has been clearly observed in statistics and has been closely related to tobacco consumption. Cigarette smoking is considered one of the major risk factors that has led to cancer development since the 50s. Researches have shown that there is a close relationship between smoking – inflammation - prothrombotic events - lung cancer. In this context, the analysis of biomarkers of inflammation is important since inflamed sites are conducive to tumor development environments. Furthermore, it is important to study the activity of ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase and ecto adenosine deaminase (E-ADA) enzymes which are engaged in regulating the levels of adenine nucleotides and nucleoside widely involved in inflammation and platelet aggregation. Oxidative stress is associated with the development and progression of cancer. Thus, it is extremely important to evaluate the aspects of cellular functions in a group of patients with lung cancer. The objectives of this study were i) to verify the serum levels of cytokines such as IL-6, IL-17, IL-4, IL-2, IL-10, interferon- γ (IFN- γ) and Tumor Necrosis Factor (TNF); ii) to evaluate the activity of the E-NTPDase, E-NPP, ecto-5'-nucleotidase and E-ADA platelets, and platelet aggregation; iii) to evaluate the activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) erythrocyte, the levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in platelet and of reactive species (RS) in serum species; and iv) to analyze the enzymatic antioxidant profile - through the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in platelets - and non-enzymatic profile - through the content of total thiols (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) in platelet and of the levels of vitamin C in plasma vitamin E in serum. The study group had non-small cell lung cancer and was treated at the Hematology/Oncology Section at the University Hospital of Santa Maria. The project was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, CAAE (Certificate of Appreciation Presentation for Ethics) and is registered under number: 0061.0.243.000-10. Results showed that patients with lung cancer presented an increase in serum levels of IL-6, which are closely related to the development and progression of tumor, since this cytokine has proinflammatory and pro-tumor activities. The levels of IL-17 were decreased in these patients, which may be related to the advanced stage of the development of lung cancer in these subjects. Patients with lung cancer showed a decrease in E-NTPDase activity for the hydrolysis of ADP, which contributes to the expansion of procoagulant effects commonly observed in patients with neoplastic diseases. This hypothesis is strengthened by the increased platelet aggregation observed when ADP was used as the agonist process. Patients enrolled in this study showed a decrease in the CD39 expression in platelets, which is in agreement with that observed for the NTPDase activity in platelets. The studied group had an increase in the ecto-5'-nucleotidase activity and a decrease in the E-ADA activity in platelets. This suggests that the extracellular adenosine levels were elevated leading to the advance of the tumor development due to the promoting actions characteristics of adenosine such as tumor growth and of stimulating angiogenesis. Regarding the oxidative profile, the activity of δ -ALA-D enzyme was inhibited in patients with lung cancer, which may predict the occurrence of oxidative stress in these patients. This scenario can be confirmed by the elevated levels of TBARS and RS observed in patients with lung cancer. This overproduction of oxidants may also be causing the inhibition of SOD and CAT enzymes in platelets and thus their structure and the function may be

compromised. Furthermore, there was a decrease in the levels of important non-enzymatic antioxidants in patients with lung cancer, showing that their beneficial actions may be occurring in an insufficient way. High levels of T-SH and possibly glutathione are implicated in the development of tumor resistance to chemotherapy. Therefore, the results described here suggest that lung cancer exerts a significant change in serum levels of IL-6 and IL-17, in the activity of the enzymes of the purinergic system in platelets, as well as in the oxidative profile of these patients. Thus, it is hoped that this work may have contributed to a better understanding of the role of the purinergic system and biomarkers of inflammation and oxidative stress in the pathophysiology of lung cancer.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 – Colapso dos mecanismos normais de controle da proliferação e maturação das células	20
FIGURA 2 – Os múltiplos estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão	22
FIGURA 3 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas)	25
FIGURA 4 – Taxas brutas de incidência de câncer estimadas para o ano 2014, por sexo, para o Estado do Rio Grande do Sul e sua capital (valor por 100 mil habitantes)	26
FIGURA 5 – Modelo de como as células tumorais “educam” as células imunes a desempenharem funções de estímulo à progressão tumoral	36
FIGURA 6 – Contribuição das plaquetas para a metástase dos tumores	38
FIGURA 7 – Visão geral e simplificada sobre a sinalização gerada pelo ADP e pelo ATP nas plaquetas	42
FIGURA 8 – Topografia de membrana das diferentes famílias de enzimas que compõem a grupo das ectonucleotidases	43
FIGURA 9 – Topografia de membrana das ectonucleotidases	44
FIGURA 10 – Membros da família das NTPDases	45
FIGURA 11 – Cascata de ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina e adenosina	47
FIGURA 12 – Dano oxidativo às macromoléculas biológicas	48
FIGURA 13 – Nível de efeitos carcinogênicos <i>versus</i> nível de radicais livres nos vários estágios do processo de carcinogênese	49
FIGURA 14 – Mecanismo enzimático antioxidante	51
QUADRO 1 – Classificação do câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC)	27
QUADRO 2 – Nomenclatura e preferência por substrato dos membros da família E-NTPDase em vertebrados	45

MANUSCRITO

- FIGURA 15 – IL-6, IL-17, IL-4 and IL-2 serum levels of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=13). * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.005$71
- FIGURA 16 – L-10 serum levels of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=13)72
- FIGURA 17 – INF- γ and TNF serum levels of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=13)73

ARTIGO 1

- FIGURA 18 – NTPDase activity in the platelets of patients with lung cancer using ATP as substrate. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n = 33)79
- FIGURA 19 – NTPDase activity in the platelets of patients with lung cancer using ADP as substrate. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=33)79
- FIGURA 20 – 5'-nucleotidase activity in the platelets of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=33)80
- FIGURA 21 – E-NPP activity in the platelets of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=33)80
- FIGURA 22 – ADA activity in the platelets of patients with lung cancer. The results were expressed as mean \pm standard deviation (n = 33)80
- FIGURA 23 – Percentage of CD39 positive cells from patients with lung cancer (n=10) when compared to the control group (n=10). The results were expressed as mean \pm standard deviation80

ARTIGO 2

- FIGURA 24 – δ -ALA-D activity in whole blood of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error (n=10). ***Indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P \leq 0.0005$)87
- FIGURA 25 – TBARS and RS levels, in platelets and serum, respectively, of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error (n=28; n=13). ** and * indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P \leq 0.005$ and $P \leq 0.05$)87

FIGURA 26 – SOD and CAT activities in platelets of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error (n=28). *Indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P\leq 0.05$)87

FIGURA 27 – T-SH and NPSH levels in platelets of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error (n=28). *Indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P\leq 0.05$)88

FIGURA 28 – Vitamin C, in plasma, and Vitamin E, in serum, levels of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error (n=28). *** and * indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P\leq 0.0005$ and $P\leq 0.05$), respectively88

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABELA 1 – Patient characteristics.....	69
TABELA 2 – Hematological profile of patients.....	70

ARTIGO 1

TABELA 3 – Patient characteristics.....	79
TABELA 4 – Platelet aggregation profile	79
TABELA 5 – Effect of drugs on NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities in platelets from control individuals	79

ARTIGO 2

TABELA 6 – Characteristics of subjects.....	86
TABELA 7 – Blood parameters of patients with lung cancer and control individuals	86
TABELA 8 – Activity of SOD and CAT and its correlation with oxidative stress parameters in patients with lung cancer	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRs	– Regiões conservadas da apirase
ACS	– <i>American Cancer Society</i>
ADA	– Adenosina desaminase
ADP	– Adenosina difosfato
AMP	– Adenosina monofosfato
ATP	– Adenosina trifosfato
bFGF	– Fator de crescimento de fibroblastos básico
CAT	– Catalase
CD39	– <i>Cluster of Differentiation 39</i>
COX-2	– Ciclooxygenase 2
CPNPC	– Carcinoma pulmonar de não pequenas células
E-NPP	– Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases
EROs	– Espécies reativas de oxigênio
GSH	– Glutathiona Reduzida
HUSM	– Hospital Universitário de Santa Maria
H₂O₂	– Peróxido de Hidrogênio
IARC	– <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IL-1β	– Interleucina 1 β
IL-2	– Interleucina 2
IL-4	– Interleucina 4
IL-5	– Interleucina 5
IL-6	– Interleucina 6
IL-8	– Interleucina 8
IL-10	– Interleucina 10
IL-17	– Interleucina 17
IL-20	– Interleucina 20
INCA	– Instituto Nacional do Câncer
INF-γ	– Interferon γ
NF-Kβ	– Fator de necrose kappa β
NPSH	– Tióis não protéicos
NTPDase	– Nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
O₂^{•-}	– Ânion superóxido

OH[•]	– Radical Hidroxila
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PBG	– Porfobilinogênio
PGD2	– Prostaglandina D2
PGE2	– Prostaglandina E2
PGF 2α	– Prostaglandina 2 α
PGG2	– Prostaglandina G2
PGH2	– Prostaglandina H2
PGI2	– Prostaglandina I2
PGs	– Prostaglandinas
SOD	– Superóxido dismutase
TBARS	– Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
Th1	– Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	– Linfócitos T <i>helper</i> 2
Th17	– Linfócitos T <i>helper</i> 17
Treg	– Células T regulatórias
T-SH	– Tióis totais
TLR	– <i>Toll-like receptors</i>
TNF-α	– Fator de necrose tumoral- α
TNM	– <i>Tumor - Node - Metastasis</i>
TxA2	– Tromboxano A2
UICC	– <i>International Union Against Cancer</i>
UTP	– Uracila trifosfato
VEGF	– Fator de crescimento do endotélio vascular
VIT C	– Vitamina C
VIT E	– Vitamina E

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Questionário	122
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	123

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	54
2.1 Objetivo geral	54
2.2 Objetivos específicos.....	54
3 MANUSCRITO E ARTIGOS	56
3.1 Manuscrito	56
3.2 Artigo 1	76
3.3 Artigo 2	83
4 DISCUSSÃO	91
5 CONCLUSÃO	100
6 PERSPECTIVAS	102
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICES	122

1 INTRODUÇÃO

No organismo sadio, o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado, para que as células constituam comunidades organizadas (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002). No entanto, com o decorrer da vida essa homeostase celular pode ser comprometida, já que a exposição das células a agentes genotóxicos ocasiona progressivo acúmulo de alterações no genoma celular, que são denominados mutações (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2006).

Todos os seres vivos são passíveis da ocorrência de mutações, sendo que elas são um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Por outro lado, algumas mutações, que ocorrem em genes específicos, podem determinar significativas alterações como, por exemplo, o crescimento celular desordenado também chamado de neoplasia (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2006), que está ilustrado na figura abaixo (Figura 1).

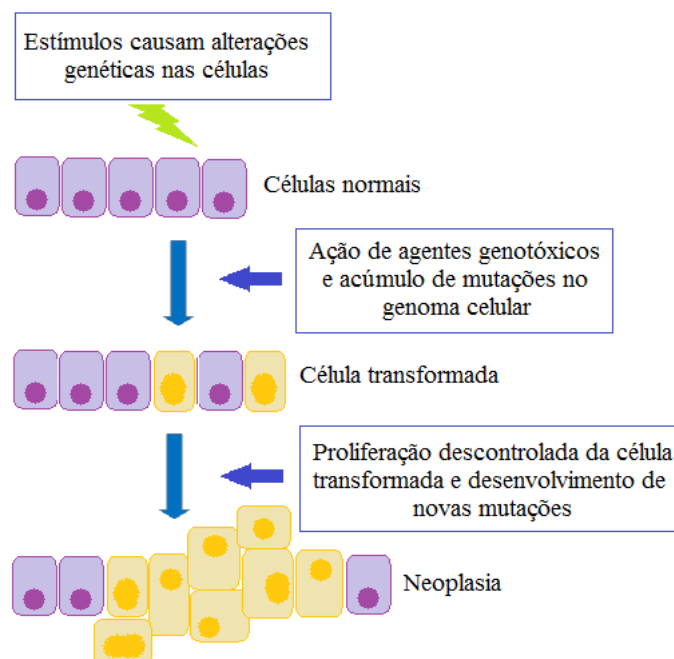


Figura 1 – Colapso dos mecanismos normais de controle da proliferação e maturação das células

Fonte: <(http://www.ebah.com.br/content/carcinogenese-neoplasia)>, com adaptações.

As mutações podem ser causadas por agentes endógenos ou exógenos que promovam falhas durante o processo de replicação celular. Dentre os agentes endógenos com capacidade mutagênica, pode-se destacar a ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), enquanto que, os agentes externos que podem provocar alterações genéticas são divididos em três classes:

- a) agentes físicos: como a luz ultravioleta e as radiações ionizantes;
- b) agentes biológicos: como alguns vírus, que se integram ao genoma celular interrompendo sequências gênicas ou promovendo rearranjos gênicos; e
- c) agentes químicos: como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas (BELTRÃO-BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2004).

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

De acordo com Valko (2006), o processo de carcinogênese, em geral, se desenvolve lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor detectável. Além disso, esse processo apresenta-se como um evento multicausal, visto que nesse processo há interação de fatores hereditários, genéticos e ambientais que culminam em um crescimento celular descontrolado (ACS, 2014). A carcinogênese é composta por múltiplos e distintos estágios, podendo-se destacar, entre eles, o processo de iniciação, a promoção e a progressão tumoral, cada um caracterizado por diferentes mecanismos (INCA, 2014a), (Figura 2).

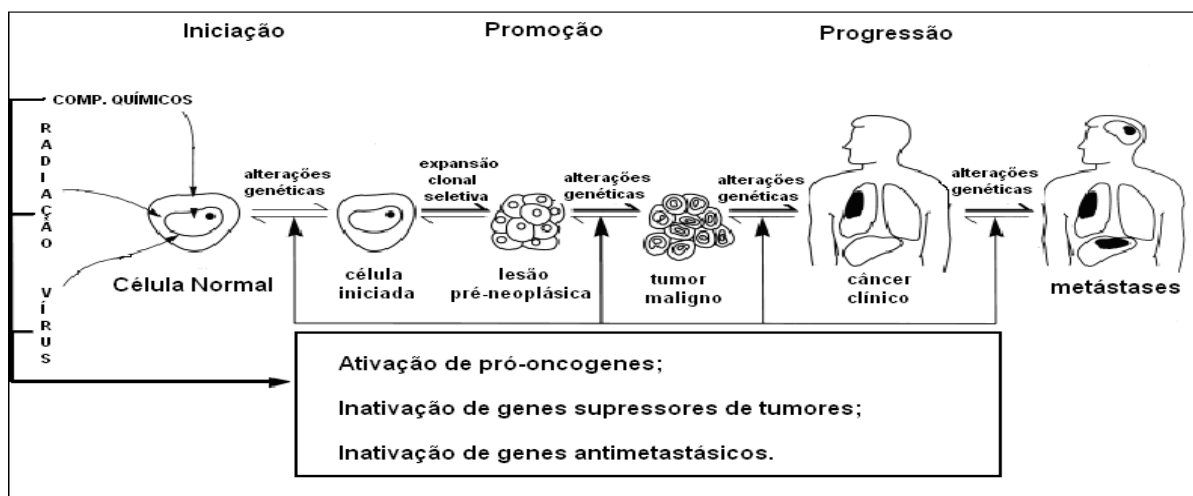


Figura 2 – Os múltiplos estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão

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

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

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

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

como gorduras, e também a exposição excessiva e prolongada a hormônios são fatores que favorecem a transformação de células iniciadas em células malignas. Por derradeiro, tem-se o processo de progressão tumoral, que é caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio, o câncer está instalado e as primeiras manifestações clínicas da doença surgem (INCA, 2014b).

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

No que diz respeito aos vasos sanguíneos que compõem esse microambiente tumoral, cumpre ressaltar que as células cancerosas, à semelhança das células normais, necessitam de oxigênio para sobreviver. A angiogênese, então, que é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de uma vascularização pré-existente, é um evento comum e fundamental durante o processo de desenvolvimento neoplásico (KUMAR et al., 2010). A vascularização dos tumores é efetuada pela liberação de fatores angiogênicos associados ao tumor, derivados de células tumorais ou de células inflamatórias, como os macrófagos que penetram nos tumores, sendo que os dois fatores angiogênicos tumorais mais importantes são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) (SOUZA, 2011).

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

As primeiras evidências científicas para essa doença foram encontradas em tumores ósseos fossilizados de múmias no Egito, datando de 3000 a.C. Muito interessante é que, já nessa época, se relatava o que hoje é ainda em parte

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

Dados mostram que o número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável, principalmente a partir do século passado, configurando-se como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005). Segundo a *American Cancer Society* (ACS, 2014), cerca de metade dos homens e um terço das mulheres do mundo vão desenvolver câncer em algum período da sua vida.

Levantamentos realizados pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer - *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estimaram aproximadamente 12,7 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de mortes por câncer para o ano de 2008 em todo o mundo. Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de novos casos de incidência de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivendo, anualmente, com câncer, incidindo o maior efeito desse aumento em países de baixa e média rendas (INCA, 2014c).

No Brasil, as estatísticas para 2014 demonstram que são esperados um total de 373.100 novos casos de câncer para o sexo masculino e 355.480 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa de que o câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira (com 224 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (86 mil), mama feminina (76 mil), cólon e reto (43 mil), pulmão (34 mil), estômago (25 mil) e colo do útero (20 mil) (INCA, 2014c).

As pesquisas também associam os prováveis novos casos de câncer no ano de 2014 ao gênero da população brasileira. Avalia-se que os 5 tumores mais incidentes para o sexo masculino serão o câncer de pele não melanoma (118 mil casos novos), de próstata (121 mil), de pulmão (21 mil), de cólon e reto (20 mil) e de estômago (16 mil). Para o sexo feminino, destacam-se, entre os 5 mais incidentes, os tumores de pele não melanoma (106 mil casos novos), de mama (76 mil), de cólon e reto (23 mil), de colo do útero (20 mil) e de pulmão (14 mil) (INCA, 2014c).

Além disso, projetou-se uma representação espacial das taxas brutas de incidência de todas as neoplasias malignas por 100 mil indivíduos em todas as Unidades Federativas Brasileiras. Nota-se, pela análise da Figura 3, que os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro, de um modo geral, apresentam as maiores taxas de incidência de tumores, tanto em homens quanto em mulheres, no Brasil.

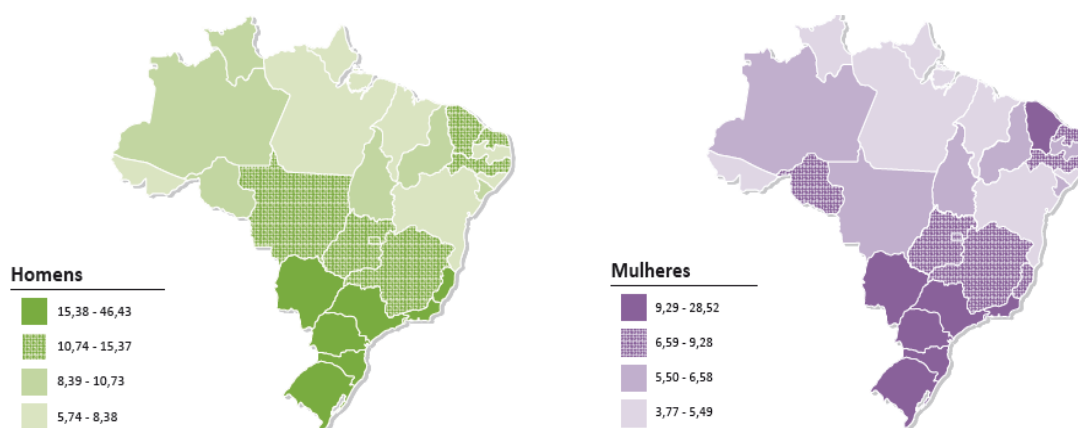


Figura 3 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas)

Fonte: <(http://www.inca.gov.br/estimativa/2014)>, com adaptações.

As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) quanto à incidência de câncer, no ano de 2014, para o Estado do Rio Grande do Sul (Figura 4), vão ao encontro dos índices apontados acima.

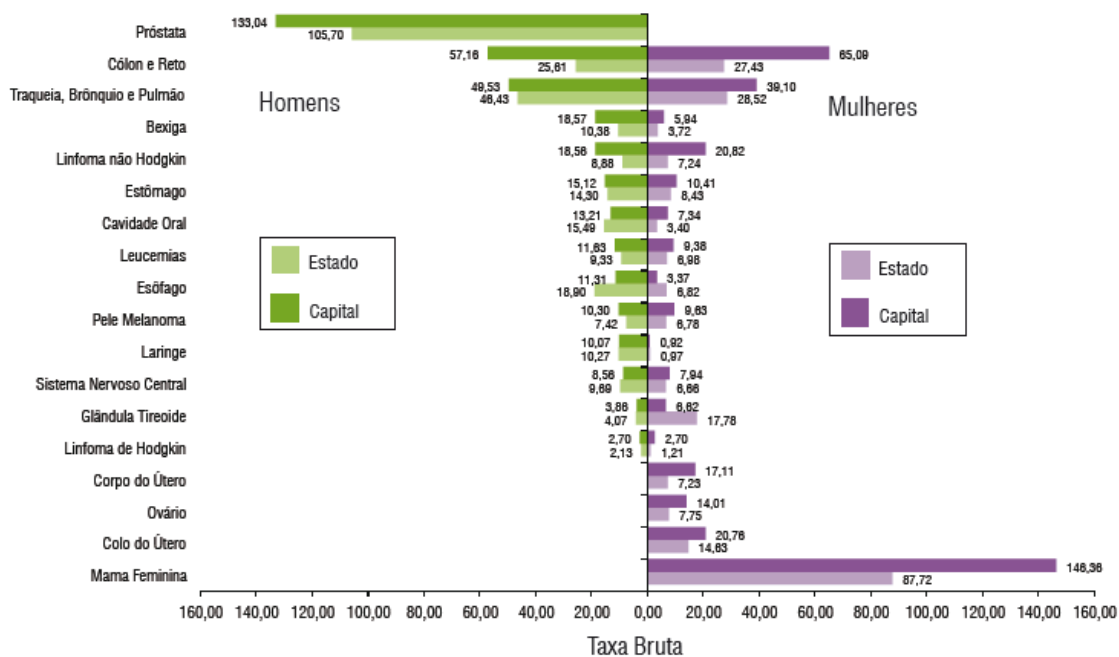


Figura 4 – Taxas brutas de incidência de câncer estimadas para o ano 2014, por sexo, para o Estado do Rio Grande do Sul e sua capital (valor por 100 mil habitantes)

Fonte: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=RS>>.

É nesse cenário que o câncer de pulmão, de doença rara no início do século XX, tornou-se uma das doenças neoplásicas mais disseminadas (PARKIN et al., 2001; ZAMBONI, 2002; WANG et al., 2010). Pesquisas recentes têm evidenciado que o câncer de pulmão é a doença neoplásica mais comumente diagnosticada, bem como a principal causa de morte por câncer nos homens em todo o mundo. Entre as mulheres, foi o quarto tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado e a segunda principal causa de morte por neoplasia (JEMAL, 2011). No Brasil, dados apontam que, entre os homens, de 1986 a 2007, as neoplasias de traquéia, brônquios e pulmões levaram a óbito um maior número de pacientes, sendo que o Rio Grande do Sul é um dos estados brasileiros com os maiores índices de mortalidade para essa patologia (BRASIL, 2010).

Ressalte-se, ainda, que, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do pulmão em homens é o segundo mais frequente nas regiões Sul (34/100 mil) e Centro-Oeste (14/100 mil), ocupando, nas regiões Sudeste (19/100 mil), Nordeste (9/100 mil) e Norte (8/100 mil), a terceira posição no *ranking* de incidência. Quanto às mulheres, é o terceiro mais frequente nas regiões Sul (21/100 mil) e

Sudeste (11/100 mil), o quarto nas regiões Centro-Oeste (8/100 mil) e Nordeste (6/100 mil) e o quinto na região Norte (5/100 mil) (INCA, 2014c).

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

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

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

Tumor primário (T):
TX – O tumor primário não pode ser avaliado ou tumor comprovado por presença de células malignas no escarro ou lavado brônquico mas não visualizado no broncoscopia ou nos exames de imagem.
Tis – Carcinoma <i>in situ</i> .

T0 – Sem evidência de tumor primário.
T1 – Tumor menor ou igual a 3 cm em sua maior dimensão, envolvido por pulmão ou pela pleura visceral, sem evidência broncoscópica de invasão mais proximal do que o brônquio lobar.
T2 – Tumor com mais de 3 cm ou qualquer uma das seguintes características: envolvimento do brônquio principal, distante ≥ 2 cm da carina; invasão da pleura visceral; associado à presença de atelectasia ou pneumonia obstrutiva que se estende à região hilar, mas não compromete todo o pulmão.
T3 – Tumor de qualquer tamanho com invasão direta de qualquer uma das seguintes estruturas: parede torácica (incluindo tumores de sulco superior), diafragma, pleura mediastinal, pericárdio parietal; tumor no brônquio principal a uma distância da carina menor que 2 cm, mas sem envolvê-la; associado à atelectasia ou pneumonia obstrutiva de todo o pulmão; ou presença de nódulos tumorais localizados no mesmo lobo do tumor primário.
T4 – Tumor de qualquer tamanho, com invasão direta de qualquer uma das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina; ou presença de nódulos tumorais localizados em um lobo diferente do tumor primário, mas ipsilateral ao tumor primário.
Linfonodos regionais (N):
NX – Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0 – Ausência de metástases nos linfonodos regionais.
N1 – Metástases para linfonodos peribrônquicos e/ou hilares ipsilaterais e/ou intrapulmonares incluindo o envolvimento desses por invasão direta do tumor primário.
N2 – Metástases para linfonodos mediastinais ipsilaterais e/ou linfonodos carinais.
N3 – Metástases para linfonodos mediastinais contralaterais, hilares contralaterais, escalenos ipsilaterais ou contralaterais ou linfonodos supraclaviculares.
Metástases a distância (M):
MX – Presença de metástases a distância não pode ser avaliada.
M0 – Ausência de metástases a distância.
M1 – Presença de metástases a distância.

M1a – Nódulos em um lobo contralateral ao tumor primário, com nódulos pleurais ou derrame pleural (ou pericárdico) maligno.			
M1b – Metástases a distância.			
Agrupamento por estágio:			
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
IIIA	T1/T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IB	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIB	qualquer T	N3	M0
	T4	qualquer N	M0
IV	qualquer T	qualquer N	M1

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

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

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

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

A disseminação do câncer de pulmão na população mundial, que é claramente observada pelos dados estatísticos, está intimamente relacionada com o consumo de tabaco nas comunidades (IARC, 2004). O tabagismo é caracterizado como um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento de câncer desde a década de 50 (SASCO; SECRETAN; STRIF, 2004) e cada vez mais estudos epidemiológicos têm sido desenvolvidos em resposta a essa plausível correlação (DUARTE; PASCHOAL, 2005; GANTI; LOBERIZA Jr; KESSINGER, 2008).

As pesquisas apontam o fumo como sendo o responsável por quase 90% dos casos de câncer de pulmão diagnosticados. Segundo estimativa do INCA, para o ano de 2002, ele foi responsável por 21.425 casos de câncer de pulmão e 15.955 mortes associadas a este diagnóstico. É importante salientar aqui que os usuários de tabaco têm cerca de 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver câncer de pulmão quando comparados aos sujeitos não fumantes (INCA, 2014c), sendo que o risco de morte por câncer de pulmão é de 7 a 14 vezes maior entre os fumantes do que entre os não fumantes (JAMNIK, 2012), razão pela qual Zander et al. (2008) afirmam que *“o câncer de pulmão é uma doença primeiramente ambiental”*.

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

É importante destacar que as alterações que as indústrias fumageiras vêm realizando, ao longo dos anos, na composição dos cigarros também favoreceram a maior incidência de neoplasias pulmonares do tipo histológico adenocarcinoma na atualidade. A redução do teor de nicotina dos cigarros contribuiu para uma

diminuição dos casos de carcinoma de pequenas células, enquanto o acréscimo dos níveis de nitrato nos cigarros, mudança que propicia um aumento dos teores de nitrosaminas produzidas durante o ato de fumar, é provavelmente o responsável pelo aumento na incidência de adenocarcinomas entre a população tabagista (ALBERG; BROCK; SAMET, 2005). Vale salientar também que na relação entre tabagismo e incidência de câncer, deve-se levar em conta a quantidade de tabaco consumido e o tempo de duração do hábito de fumar, estabelecendo-se um binômio dose-resposta (MACFARLANE et al., 1995; GARROTE et al., 2001).

Os danos ao organismo humano provenientes do tabagismo não afetam apenas as pessoas que fumam, mas também às não fumantes, que vivem sob a poluição proveniente da fumaça de cigarros nos domicílios, nos ambientes de trabalho e de lazer e, por isso, são considerados fumantes passivos. A poluição ambiental decorrente da fumaça exalada pelo fumante (caracterizada como corrente primária ou principal) corresponde a 25% do total de poluição dispersada; já aquela proveniente da queima da ponta do cigarro e de outros produtos do tabaco (caracterizada como corrente secundária), corresponde aos 75% restantes da poluição ambiental proveniente do hábito de fumar. Ressalte-se que a corrente secundária é a mais importante fonte de poluição ambiental e aquela que apresenta as maiores concentrações de todos os componentes carcinogênicos constituintes do tabaco (ARAÚJO, 2007).

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

É por isso que estudos têm sugerido que as neoplasias podem ser originadas em sítios expostos cronicamente a agentes irritantes e que os processos inflamatórios presentes nesses sítios também podem ser os responsáveis pela origem de tumores (HUANG; CHEN, 2011). As pesquisas recentes demonstram que o consumo de cigarros promove significativos efeitos pró-inflamatórios, por meio da estimulação da expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) em uma grande variedade de células, como em células T, em células neoplásicas pulmonares e em

células escamosas de cabeça e pescoço (HUANG; CHEN, 2011). Desse modo, a estimulação da COX-2 pelo tabagismo pode estar envolvida na progressão dos processos inflamatórios em fumantes, fato que contribui significativamente para o desenvolvimento e evolução das doenças neoplásicas nesses indivíduos.

Reforçando o exposto, diversos autores relataram uma significativa expressão da COX-2 em diferentes neoplasias, como câncer de pulmão (HIDA et al., 1998), de esôfago (WILSON et al., 1998) e de mama (HARRIS et al., 2009), o que sugere que essa proteína possa participar de passos importantes durante os processos de carcinogênese. A COX-2 é responsável pela conversão do ácido araquidônico em eicosanóides, como as prostaglandinas (PGs) (HASTÜRK et al., 2002). A via ciclooxigenase leva à formação das prostaglandinas PGG₂ e, em sequência, das PGH₂ e, a partir delas, há formação dos seus derivados biologicamente ativos, quais sejam, as prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF₂α, PGI₂ (prostaciclina) ou TxA₂ (tromboxano A₂) (SMITH, 1992; VANE; BOTTING, 1998; SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000).

Entre as PGs, a PGE₂ é uma das biomoléculas mais extensamente estudadas em relação ao seu potencial envolvimento na progressão tumoral, já que ela exerce uma série de efeitos inibitórios no sistema imunológico, podendo afetar os processos de diferenciação e proliferação celular (RÖSCH et al., 2005; HARRIS, 2009). Como citado anteriormente, a fumaça do cigarro induz o aumento da expressão da COX-2, elevando, dessa maneira, a liberação de PGE₂ a partir de muitos tipos celulares, como fibroblastos (MARTEY et al., 2004; WANG; HONN; NIE, 2007), monócitos sanguíneos (MARTEY et al., 2005), macrófagos alveolares (BELOQUI et al., 2005; PROFITA et al., 2010), células dendríticas pulmonares (HWANG et al., 1999) e neutrófilos (BELOQUI et al., 2005), sendo que a maioria deles faz parte do sistema imunológico.

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

De acordo com Gately (2000), a angiogênese pode ser induzida pela COX-2 através: a) do estímulo à expressão de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); b) da geração de produtos dos

eicosanóides, como tromboxano A_2 (Tx A_2), PGE2 e PGI2, que diretamente estimulam a migração endotelial; e c) da inibição da apoptose endotelial.

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

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

Os linfócitos são células sanguíneas originadas na medula óssea a partir de um único precursor hematopoético comum (*Stem cell*, ou célula indiferenciada pluripotente). Eles são leucócitos do tipo agranulócitos presentes no sangue em quantidades que variam sob as condições fisiológicas (como idade e sexo) e que correspondem a cerca de 30% (trinta por cento) das células circulantes do sangue, sendo as principais células envolvidas no reconhecimento e destruição de antígenos não-próprios ou prejudiciais ao organismo (BOER; PERELSON, 2013).

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

Os linfócitos T são encarregados da imunidade mediada por células subdividindo-se em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), que quando ativados atuam

eliminando células infectadas, e em linfócitos T *helper* (Th) (CD4⁺), que atuam secretando citocinas reguladoras do sistema imune. As células CD4⁺ podem, ainda, ser dos tipos Th1, Th2 e Th17, de acordo com o tipo de citocinas que produzem.

As células Th1 secretam:

a) Interleucina 2 (IL-2), que é responsável pela ativação de células CD4⁺ e CD8⁺, atua como um fator de proliferação de células B, estimulando a síntese de anticorpos, além de promover a proliferação e diferenciação de células *natural killer* (NK), de modo a incrementar as ações citolíticas dessas células. Em contrapartida, a IL-2 apresenta fundamental papel no desenvolvimento de células T reguladoras (Treg), as quais induzem a supressão de células T efetoras, bloqueando a ativação e a função desses linfócitos controlando, desse modo, as respostas imunes (ABBAS; LICHTMAN, 2009);

b) Interferon γ (INF- γ), que tem a função de ativar macrófagos, incrementar a atividade citotóxica de outras células e aumentar a capacidade de apresentação de antígenos pelas células de defesa, além de induzir a apoptose de células epiteliais e estimular o desenvolvimento de mais células Th1 (ABBAS; LICHTMAN, 2009) e;

c) Fator de Necrose Tumoral α e β (TNF- α , TNF- β) que estimulam o recrutamento de neutrófilos e monócitos, além de participarem da imunidade antitumoral.

Já, as Th2 secretam:

a) Interleucina 4 (IL-4), que inibe a ativação de macrófagos e promove o desenvolvimento e a expansão das células Th2, suprimindo o desenvolvimento de células Th1, além de inibir a produção de citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o TNF- α ;

b) Interleucina 5 (IL-5) que induz a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (ADAM; ODHAV; BHOOLA, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2009);

c) Interleucina 6 (IL-6) que está envolvida na regulação das respostas imunes, na hematopoiese e na inflamação. Auxilia a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e medeia a ativação, crescimento e diferenciação de células T (BENCHETRIT et al., 2002);

d) Interleucina 10 (IL-10) que apresenta-se como um fator anti-inflamatório regulador das respostas imunes, inibe a expressão da maioria das citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e receptores de quimiocinas. Ela

inibe a ação de macrófagos ativados como, por exemplo, a secreção de TNF, além de inibir a síntese de $\text{INF-}\gamma$ (BENCHETRIT et al., 2002).

Os linfócitos Th 17 secretam IL-17, IL-21 e IL-22 que apresentam significativa importância na resposta imune contra vírus, bactérias e fungos, assim como na patogênese das doenças inflamatórias como no câncer (KARCZMARCZYK; KARP; GIANNOPOULOS, 2014).

Os mecanismos que correlacionam imunidade inata e adquirida, inflamação e câncer ainda são pouco claros, porém sabe-se que tumores malignos expressam vários tipos de moléculas que podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico como antígenos estranhos. O principal mecanismo imunológico de erradicação tumoral é a eliminação das células tumorais pela ação de linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocytes* – CTL) específicos para antígenos tumorais. Contudo, as respostas imunológicas, com frequência, falham na verificação do crescimento tumoral, porque essas respostas são ineficazes ou porque os tumores evoluem no sentido de esquivar-se de um ataque imunológico através da produção de citocinas imunossupressoras como, por exemplo, a interleucina 10 (IL-10), que tem a capacidade de inibir a ação de macrófagos e a síntese de $\text{INF-}\gamma$ (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

Por outro lado, estudos apontam que a produção de citocinas pró-inflamatórias, pelas células imunes ativadas, e a ativação de *toll-like receptors* (TLRs) presentes nas células tumorais podem mediar a comunicação entre os diferentes sistemas. De fato, os TLRs são um componente da resposta imune inata e a sua expressão tem sido relacionada com o aumento da malignidade e da resistência à quimioterapia e à radioterapia em diversos tipos tumorais (CHEN et al., 2008). Em geral, a ativação de TLRs culmina na indução de fator nuclear- κB (NF- κB) e na consequente produção de citocinas pró-inflamatórias que estimulam o avanço tumoral (SHISHODIA; AGGARWAL, 2002; PIKARSKY et al., 2004).

Há uma teoria que sugere que células tumorais podem modular a resposta imune em seu favor por meio da secreção de citocinas. O modelo proposto por Chen e colaboradores (2008) revela que as células tumorais, através da produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6), produzida por fagócitos mononucleares, linfócitos T e B, fibroblastos, células endoteliais entre outras, e o $\text{TNF-}\alpha$, recrutam células imunes para o microambiente tumoral e essas células

imunes “diferenciadas”, então, são induzidas pelas células neoplásicas a desempenhar funções de suporte e progressão tumoral através da produção de citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2009) (Figura 5).

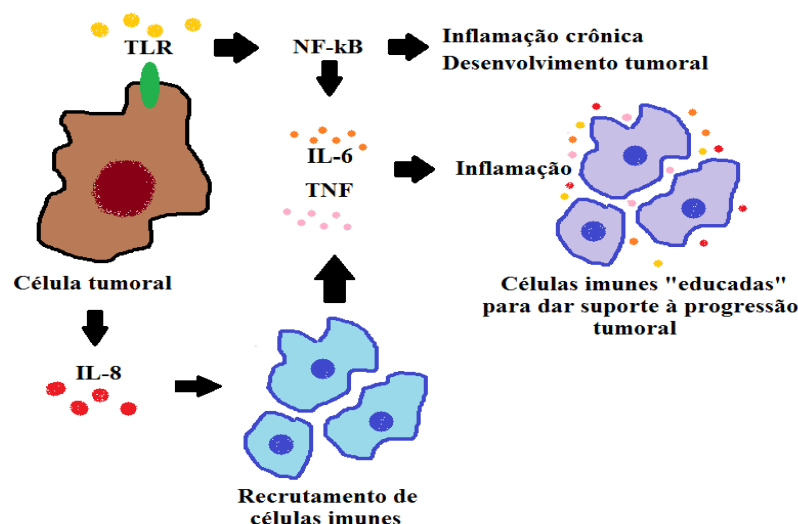


Figura 5 – Modelo de como as células tumorais “educam” as células imunes a desempenharem funções de estímulo à progressão tumoral

Fonte: CHEN et al. (2008), com adaptações.

Além da IL-6, destaca-se, nesse ponto, a importância da IL-17 nos processos tumorais. A IL-17 é sintetizada pelas células Th17 e apresenta destaque na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Ela é considerada uma citocina pró-inflamatória porque aumenta a síntese de IL-6 e IL-8 pelos macrófagos e fibroblastos, ela também induz a secreção de IL-1 β e TNF- α pelos macrófagos e células endoteliais em humanos (ZHU et al., 2008).

A literatura relata que a IL-17 está relacionada com os processos de asma alérgica (AKDIS et al., 2011), patologia caracterizada como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas. Além disso, o aumento em sua expressão está relacionado com uma maior capacidade invasiva dos tumores de mama (ZHU et al., 2008) e com a promoção de metástases em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (LI et al., 2012).

Contudo, o papel da IL-17 na iniciação, na progressão e na metástase tumoral é ainda muito controverso. Em contraste ao exposto acima, outros estudos mostram que a IL-17 poderia promover a rejeição de tumores hematopoiéticos e diminuir a ocorrência de metástases (HIRAHARA et al., 2001; BENCHETRIT et al., 2002). Além

disso, foi demonstrado que adenocarcinomas teriam se desenvolvido com maior facilidade em modelos animais deficientes em IL-17 (KRYCZEK et al., 2009).

Ademais, os processos de angiogênese que ocorrem durante o desenvolvimento e a progressão tumoral também são influenciados pelas citocinas. A literatura relata que as interleucinas 8 e 20 (IL-8 e IL-20) estão associadas ao processo do desenvolvimento de neovascularização (AKDIS et al., 2011), verificando-se, portanto, o envolvimento dessas moléculas nos três passos da carcinogênese referidos no início desta exposição: a iniciação, a promoção e a progressão tumoral.

Como já mencionado anteriormente, há uma estreita relação entre a ocorrência de processos inflamatórios e o desenvolvimento de tumores. Entretanto, nesse momento, faz-se necessário destacar que a ocorrência de processos trombóticos, em pacientes que apresentam doenças neoplásicas, também vêm sendo extensamente descrito na literatura (KARIMI; COHAN, 2010; ZANINI et al., 2012; GOUBRAN et al., 2013; STEGNER; DÜTTING; NIESWANDT, 2014).

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares anucleados, originados de seus precursores, megacariócitos, na medula. Quando há lesão endotelial ocorre uma sinalização que desencadeia a ativação plaquetária e gera uma rápida remodelação desses fragmentos celulares, assim como uma mudança na morfologia dos mesmos. Nesse processo de ativação plaquetária há também a secreção de proteínas adesivas como o fator de von Willebrand e fibrinogênio, liberação de ADP – molécula com ações pró-coagulantes – além da liberação de tromboxano A₂ (TxA₂), que contribuem significativamente para o recrutamento de outras plaquetas, culminando na formação do trombo (STEGNER; NIESWANDT, 2011).

No entanto, a ativação plaquetária também pode ser estimulada na presença de células tumorais. Na circulação sanguínea, as células malignas podem ativar plaquetas pelo contato direto ou através da liberação de mediadores agonistas da agregação plaquetária como o ADP, a trombina, o TxA₂ ou através de proteinases associadas aos tumores (KARIMI; COHAN, 2010; GOUBRAN, 2013).

O câncer e a trombose foram relacionados pela primeira vez em 1865, quando Armand Trousseau, um médico francês de renome, descreveu uma tromboflebite como um sinal de advertência para uma malignidade visceral previamente oculta (VARKI, 2007). A literatura destaca também que o aumento na contagem de plaquetas está sendo inversamente correlacionado com a

sobrevivência dos pacientes com câncer, sendo que a ocorrência de trombocitose é um marcador de pior prognóstico (WAN et al., 2013).

Além do que foi exposto acima, a correlação entre plaquetas e progressão tumoral é oportuna, tendo em vista que as plaquetas facilitam a sobrevivência de células tumorais na circulação sanguínea. As plaquetas protegem as células malignas do contra-ataque das células do sistema imune favorecendo, dessa maneira, o extravasamento de células tumorais para outros tecidos e conseqüentemente a formação de metástases (STEGNER; DÜTTING; NIESWANDT, 2014). A Figura 6 esquematiza essa situação.

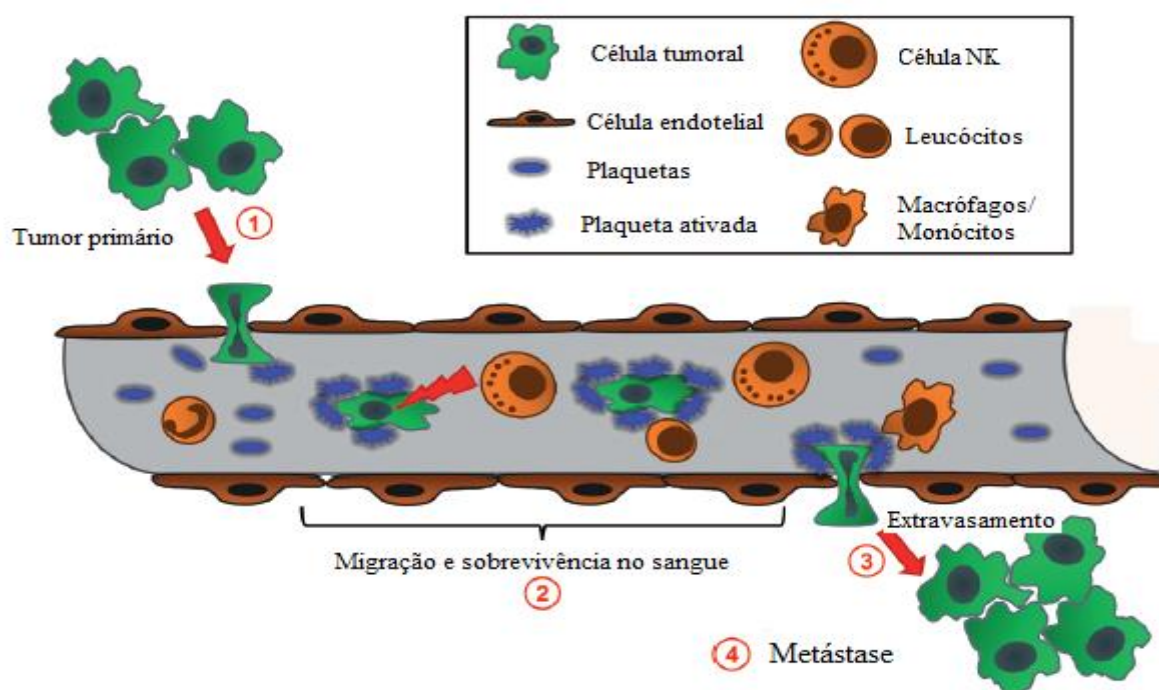


Figura 6 – Contribuição das plaquetas para a metástase dos tumores

Fonte: STEGNER; DÜTTING; NIESWANDT (2014), com adaptações.

Ante o exposto, fica evidente a íntima relação tanto das células imunes, quanto das plaquetas durante as etapas de desenvolvimento e progressão das doenças neoplásicas, tornando fundamental demonstrar a importância que uma classe de moléculas sinalizadoras tem nesses processos: os nucleotídeos ATP, ADP e AMP e o seu nucleosídeo correspondente, a adenosina (YEGUTKIN et al., 2002).

Apesar de tradicionalmente serem atribuídas aos nucleotídeos ações estritamente intracelulares, atualmente está bem estabelecido o conceito de que essas moléculas também atuam como mensageiros extracelulares, capazes de

sinalizar uma série de efeitos biológicos (BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2007). Entre esses efeitos biológicos, é de suma importância destacar aqueles relacionados ao sistema de sinalização purinérgica no controle das respostas imunes, inflamatórias e na agregação plaquetária (KANTHI et al., 2014), condições que, como já referido anteriormente, se relacionam em maior ou menor grau com as doenças neoplásicas.

Devido à habilidade que os nucleotídeos extracelulares têm em atuar como fatores indutores de crescimento e proliferação celular (RATHBONE et al., 1999), muitos estudos têm apontado que a sinalização purinérgica pode estar envolvida com a progressão tumoral (WHITE; BURNSTOCK, 2006).

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

Uma vez liberados, os nucleotídeos interagem com receptores purinérgicos específicos, mediando eventos de resposta imune, de inflamação, de agregação plaquetária, entre outros (BURNSTOCK, 2007; BERGAMIN et al., 2012; DI VIRGILIO, 2012). Esses receptores são divididos em duas subfamílias: aqueles acoplados à proteína G (P2Y) e aqueles ligados a canais iônicos (P2X), sendo que, em mamíferos, já foram identificados oito tipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) e sete tipos de receptores P2X (P2X1 – P2X7) (BURNSTOCK, 2006). A sinalização purinérgica é finalizada, então, pela ação de ectoenzimas que hidrolisam os nucleotídeos até os seus respectivos nucleosídeos, no meio extracelular (ZIMMERMANN, 1994).

Os nucleotídeos, especialmente o ATP, atuam como moléculas sinalizadoras endógenas de injúrias, desencadeando uma resposta do sistema imune (ZHANG; MOSSER, 2008). Estudos revelam que o ATP está envolvido em diversas funções

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

Para uma melhor compreensão do envolvimento da sinalização purinérgica com o desenvolvimento neoplásico, os receptores purinérgicos denominados como receptores do tipo P2 devem ser destacados. A literatura relata o receptor P2X7, também conhecido como P2Z (DI VIRGILIO et al., 2001), como sendo um dos receptores purinérgicos mais estudados em uma série de patologias, inclusive no câncer (BURNSTOCK, 2008). Tudo isso se deve à sua peculiar habilidade de sofrer uma progressiva alteração no seu formato, induzida pelo ATP, o que pode levar à geração de um poro não seletivo na membrana (BURNSTOCK, 2012).

A presença do receptor P2X7 já foi descrita em diversas células, tais como macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos. Intrigante é o fato de que a ativação deste receptor pelo ATP, dependendo das concentrações extracelulares, é capaz de induzir dois efeitos antagônicos: proliferação celular, quando em baixas concentrações, e morte celular via necrose ou apoptose, quando em altas concentrações (DI VIRGILIO, 2000; ADINOLFI et al., 2005; DI VIRGILIO, 2012).

Esse receptor é também um dos principais mediadores da resposta inflamatória induzida pelo ATP, o que pode ter consequências importantes no que tange ao avanço tumoral. Estudos recentes *in vivo* demonstraram que o ATP se acumula na periferia dos tumores, podendo modular uma série de sinalizações que controlam a resposta inflamatória e que estimulam a proliferação tumoral (BRAGANHOL, 2010).

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

Em relação à ativação plaquetária, os nucleotídeos de adenina (ATP e ADP), liberados pelas células danificadas e que são secretados pelos grânulos densos das plaquetas, contribuem para esse mecanismo agindo através dos receptores na superfície das plaquetas. O ADP age através dos receptores P2Y1 e P2Y12. O ATP age através do receptor P2X1. O estímulo das plaquetas pelo ADP leva a mudança no formato, na agregação e na geração de TxA₂. A co-estimulação de ambos os receptores (P2Y1 e P2Y12) é requerida para a indução da agregação plaquetária pelo ADP (KAHNER et al., 2006), embora os últimos estudos enfatizem que o receptor P2Y12 parece ter maior influência quanto à ativação plaquetária (MOHEIMANI; JACKSON, 2012).

O estímulo do receptor P2X1 pelo ATP está envolvido na mudança do formato das plaquetas e ajuda a ampliar as respostas mediadas pelos outros agonistas (KAHNER et al., 2006). A ligação do ADP nos receptores P2Y1 gera a ativação da fosfolipase A2 que ativa a geração de TxA₂. Tanto a ativação dos receptores P2Y1 quanto a ligação do ATP nos receptores P2X (principalmente o P2X1) gera mobilização e influxo de Ca²⁺ e mudança no formato das plaquetas. Todos esses fatores levam à ativação plaquetária e à estabilização de agregados plaquetários já existentes. A Figura 7 mostra o resumo do mecanismo de ativação plaquetária gerado pelo ADP e pelo ATP de acordo com o exposto por Kahner et al. (2006) e Moheimani e Jackson (2012).

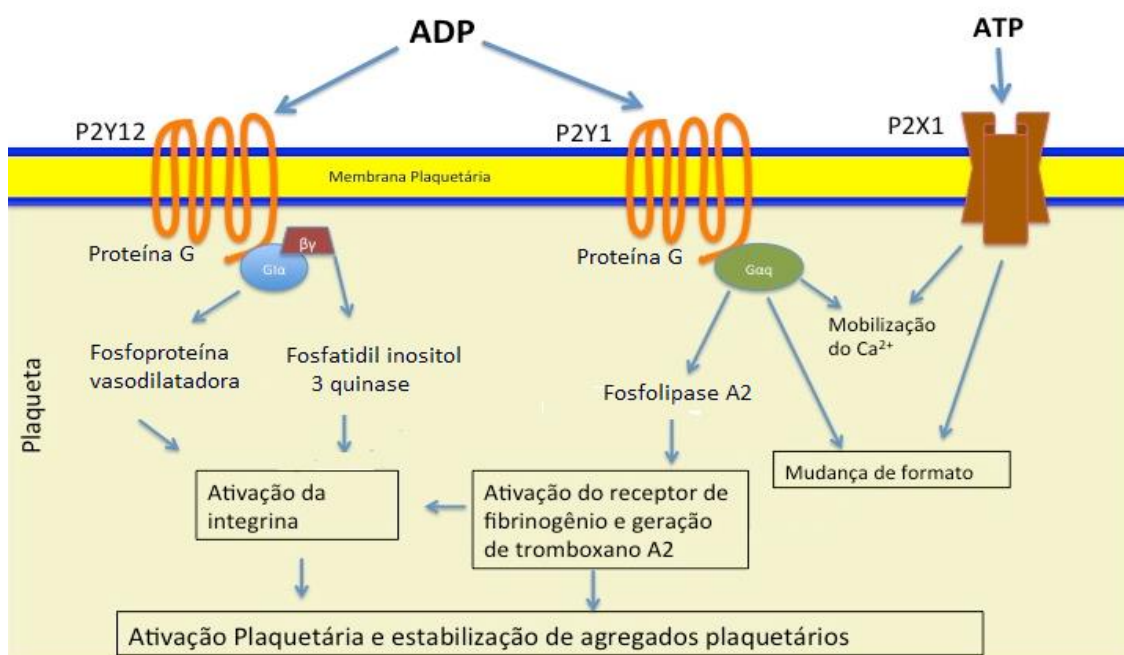


Figura 7 – Visão geral e simplificada sobre a sinalização gerada pelo ADP e pelo ATP nas plaquetas

Fonte: CARDOSO (2014), com adaptações.

Além dos nucleotídeos ATP e ADP, o seu nucleosídeo correspondente, a adenosina, também é considerado uma molécula sinalizadora de dano celular, porém com ações contrárias às do ATP (BOURS et al., 2006). A adenosina, por sua vez, medeia seus efeitos através de receptores de adenosina acoplados a proteína-G. Existem quatro tipos de receptores: A1, A2A, A2B e A3, os quais são proteínas transmembrana acopladas à proteína G.

A adenosina medeia uma resposta imunossupressora e anti-inflamatória, atuando como agente protetor dos tecidos saudáveis contra os ataques promovidos pelas células de defesa. Entre as ações imunes da adenosina, estão incluídas a promoção da maturação dos monócitos (SPYCHALA, 2000; DUNWIDDIE; MASINO, 2001), a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- γ) (HASKÓ et al., 2009), a inibição da adesão de linfócitos a respostas inflamatórias (ODASHIMA et al., 2005) e a inibição da proliferação de células T (SPYCHALA, 2000; GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007). A adenosina ainda apresenta-se como um potente inibidor da agregação plaquetária, assim como um importante modulador do tônus vascular (ANFOSSI et al., 2002; BOROWIEC et al., 2006).

Todavia existem controvérsias sobre os efeitos benéficos da adenosina, havendo relatos, na literatura, de que ela apresenta propriedades pró-

carcinogênicas, entre as quais se destacam as funções promotoras de crescimento tumoral, de estímulo à angiogênese e de redução da hipóxia tecidual, através de sua atividade vasodilatadora, fatos que podem agravar ainda mais o estado de saúde dos pacientes que já apresentam câncer de pulmão (GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007; DI VIRGILIO, 2012).

Como já referido, a concentração dos nucleotídeos extracelulares pode ser modulada pela atividade de enzimas denominadas ectonucleotidases. Em nosso laboratório, os estudos já realizados demonstraram alterações na hidrólise dos nucleotídeos da adenina em patologias como: diabetes (LUNKES et al., 2003; SCHMATZ et al., 2009;), câncer de mama (ARAÚJO et al., 2005), câncer de pulmão (ZANINI et al., 2012; ZANINI et al., 2013), artrite reumatóide (BECKER et al., 2010), esclerose múltipla (SPANVELLO et al., 2010), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007), infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008), cardiopatia isquêmica (BAGATINI et al., 2011), dentre outras (SCHETINGER et al., 2007).

Nesse processo, diferentes famílias de ectoenzimas trabalham de forma orquestrada, dentre as quais estão incluídas as ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDase), as ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP), as ecto-5'-nucleotidase e as fosfatases alcalinas (ZIMMERMANN 2001; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006) (Figura 8).

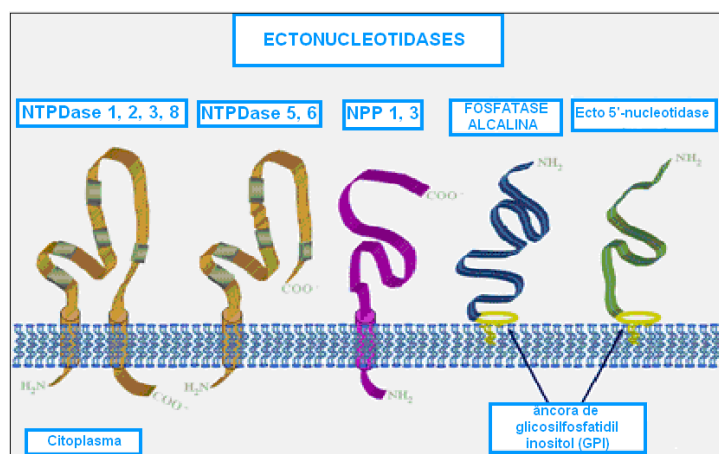


Figura 8 – Topografia de membrana das diferentes famílias de enzimas que compõem o grupo das ectonucleotidases

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

As E-NTPDases constituem uma classe de ectoenzimas ancoradas à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos, com o sítio ativo voltado para o meio extracelular. Essas enzimas são caracterizadas pela sua capacidade de

hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001), pela sua dependência de cátions divalentes para exercer sua atividade catalítica (PLESNER, 1995) e por apresentarem um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões, conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs) as quais são extremamente importantes para a atividade catalítica (ZIMMERMANN, 1999) (Figura 9).

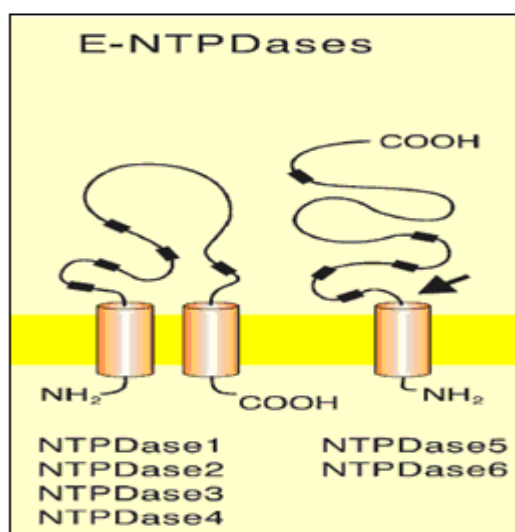


Figura 9 – Topografia de membrana das ectonucleotidases

Fonte: ZIMMERMANN (2001), com adaptações.

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

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

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

Fonte: ZIMMERMANN (2001), com adaptações.

As NTPDases 1, 2, 3 e 8 são ligadas à membrana da superfície plasmática por meio de dois domínios transmembrana N e C-terminal citoplasmáticos, apresentam o sítio catalítico voltado para a face extracelular e são as principais responsáveis pela metabolização dos nucleotídeos no meio extracelular. As NTPDase 4, 5, 6 e 7, por sua vez, exibem localização intracelular (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006) (Figura 10).

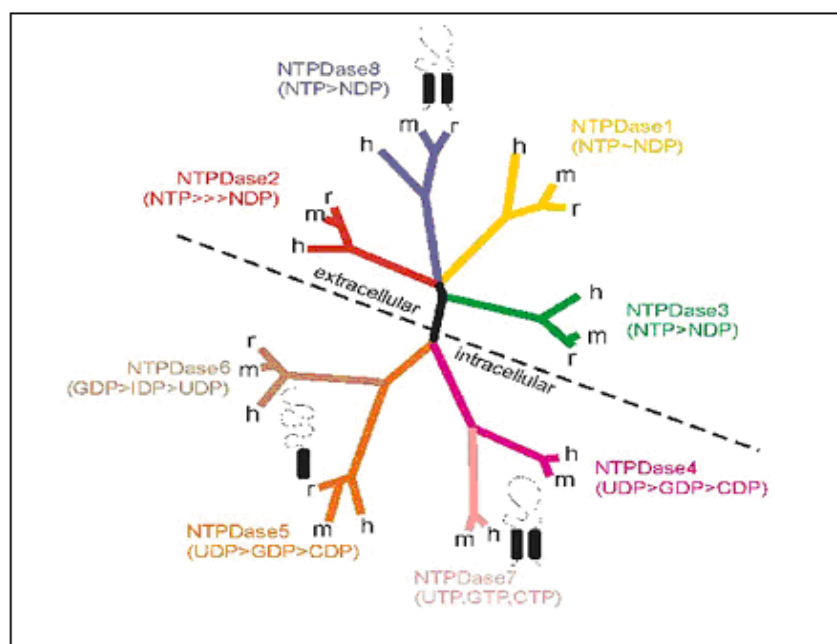


Figura 10 – Membros da família das NTPDases

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

A identidade molecular do primeiro membro da família das E-NTPDases, a NTPDase1 (ATP difosfohidrolase, Apirase, EC 3.6.1.5, CD39), foi revelada somente na metade da década de 90. Estudos posteriores mostraram que a NTPDase1 é abundantemente expressa nos vasos sanguíneos (nas células endoteliais e nas células musculares lisas), nas células dendríticas, nos linfócitos e em uma variedade de outras células (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

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

Atualmente, muita atenção tem sido direcionada para o papel da NTPDase1 em contribuir para propriedades anti-inflamatórias das células T. As propriedades imunomodulatórias das células T regulatórias (Treg) têm sido atribuídas, em parte, à expressão da NTPDase1, resultando na degradação do ATP à adenosina, a qual estimula os receptores A2A nas células T efetoras ativadas culminando em imunossupressão (KANTHI et al., 2014). Além disso, a presença da NTPDase1 na superfície celular parece proteger as células T contra a apoptose induzida pelo ATP e existe uma correlação positiva entre a atividade das ectonucleotidases e a ativação dos linfócitos (DOMBROWSKI et al., 1998; KANTHI et al., 2014).

A família das E-NPPs (EC 3.1.4.1) consiste de sete membros (E-NPP1-7), mas apenas a E-NPP1, 2 e 3 tem a capacidade de hidrolisar nucleotídeos (STEFAN; JANSEN; BOLLEN, 2006). As E-NPPs hidrolisam o ATP diretamente à AMP, e, desta forma, podem cancelar a sinalização através dos receptores P2. Assim como as NTPDases, as E-NPPs também encontram-se amplamente distribuídas no organismo (KUKULSKI, LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011).

A família da 5'-nucleotidase possui sete membros, seis citosólicos e uma ectoenzima, a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, também conhecida como CD73) (YEGUTKIN, 2008). A principal função dessa enzima é a geração de adenosina extracelular, a partir do AMP, sendo responsável pela ativação dos receptores P1. Essa ativação pode ser cancelada através da ação das enzimas purina nucleosídeo fosforilase (PNP) e adenosina desaminase (ADA) (KUKULSKI, LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011).

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

A figura 11 apresenta a cascata de hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina de forma resumida.

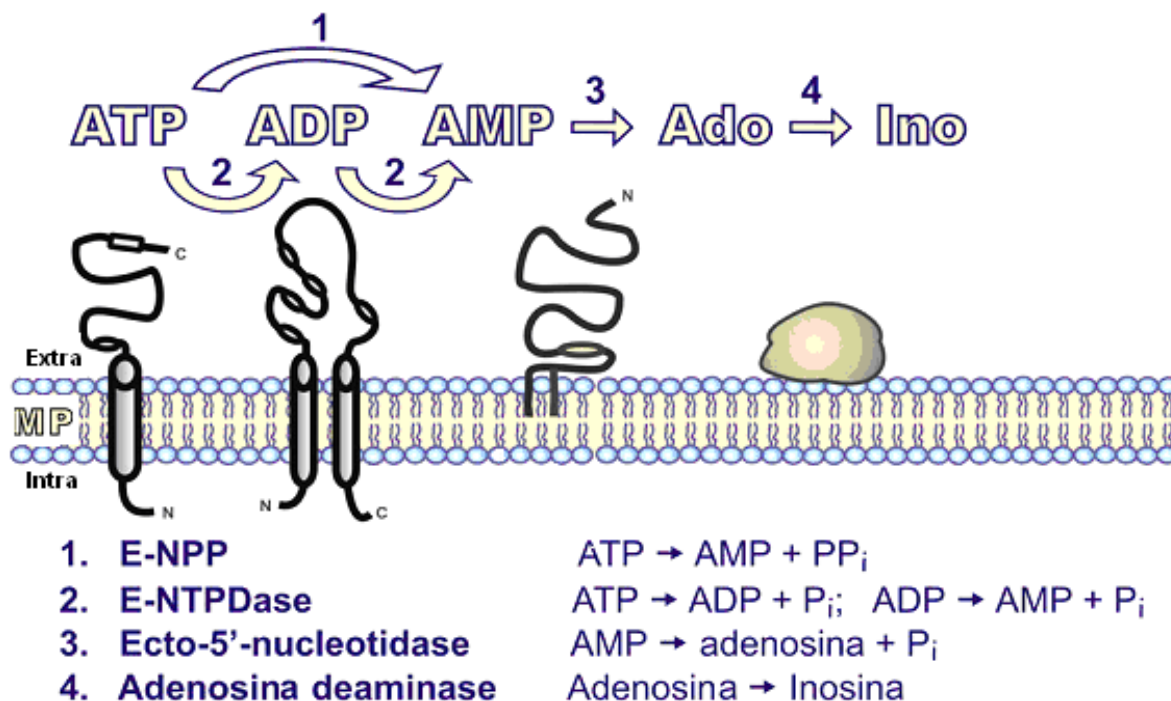


Figura 11 – Cascata de ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina e adenosina

FONTE: Yegutkin (2008), com adaptações.

Em conjunto, as ectoenzimas descritas acima são capazes de regular a concentração extracelular dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina que são importantes sinalizadores dos eventos inflamatórios e trombóticos (YEGUTKIN, 2008), os quais apresentam ampla relação com o desenvolvimento dos tumores.

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

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, em particular as EROs, e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies. Quando há um favorecimento à produção de EROs e um quadro de estresse oxidativo é instalado, a transformação progressiva de células

para a sua forma maligna ocorre mais facilmente, proporcionando um aumento na frequência de mutações pelos danos ao DNA e, conseqüentemente, um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias (ARDIES, 2003; COOK et al., 2004; GOTO et al., 2007).

As EROs apresentam potencial para causar danos irreversíveis em biomoléculas importantes, tais como lipídeos de membrana, proteínas e DNA, através de sua capacidade de induzir alterações bioquímicas (TANIYAMA; GRIENDLING, 2003; WU et al., 2004) (Figura 12).

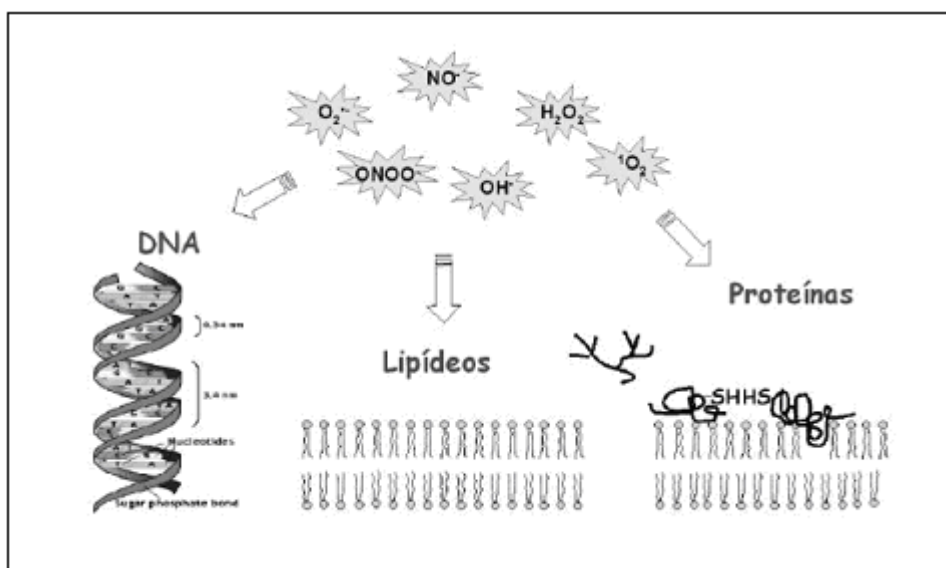


Figura 12 – Dano oxidativo às macromoléculas biológicas

Fonte: TORRES (2003), com adaptações.

É importante frisar que as células do tumor são conhecidas por serem os principais responsáveis pela produção e liberação de EROs na circulação (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004) e, para tanto, vários mecanismos que conduzem ao estresse oxidativo foram propostos em pacientes com câncer, dentre eles encontramos alterações no metabolismo energético (BAKAN et al., 2003), a inflamação crônica não-específica (KAYNAR et al., 2005) e por fim o uso de drogas antineoplásicas (GUPTA et al., 2009).

Diversos estudos evidenciam o envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento do câncer (TOYOKUMI et al., 1995; MALDONADO et al., 2006; FARIAS et al., 2011), sendo que, outros trabalhos, como o desenvolvido por Klaunig e Kamendulis (2004), demonstram que o estresse oxidativo participa diretamente da iniciação, promoção e progressão tumoral (Figura 13).

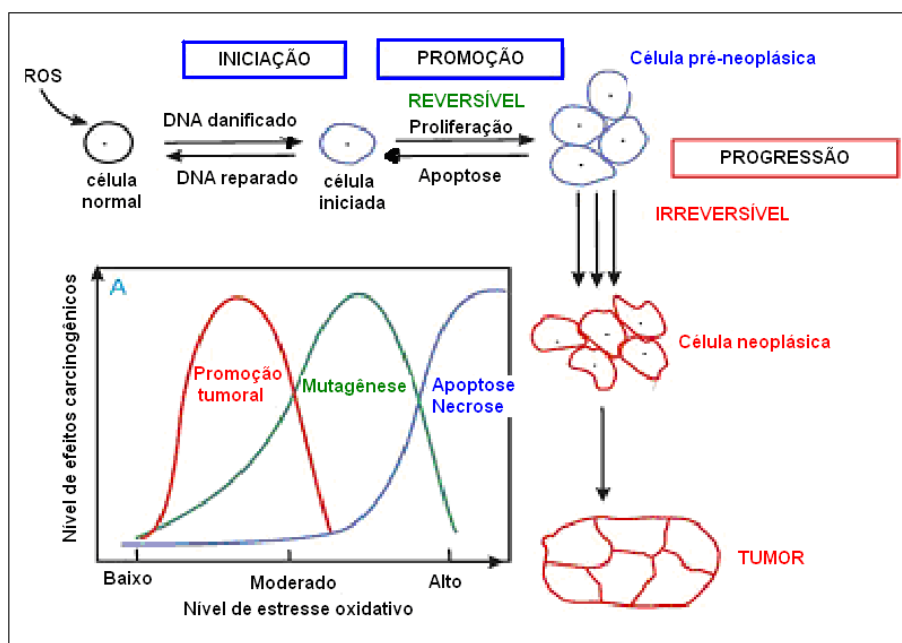


Figura 13 – Nível de efeitos carcinogênicos *versus* nível de radicais livres nos vários estágios do processo de carcinogênese

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

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

Nesse contexto, destaca-se a enzima δ -aminolevulínico desidratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24) que tem sido utilizada, juntamente com parâmetros de estresse oxidativo, como biomarcador de danos oxidativos e de alterações nos processos metabólicos em diversas patologias, já que ela é uma enzima de natureza sulfidrílica e uma diminuição na sua atividade está relacionada com a superprodução de EROs (SOUZA, 2004).

A enzima citoplasmática δ -ALA-D, também conhecida como porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50. Esta enzima é uma metaloproteína que catalisa a formação do composto monopirrólico, porfobilinogênio (PBG), através da condensação e ciclização assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (δ -ALA) com perda de duas moléculas de água. Assim, por participar da biossíntese de moléculas tetrapirrílicas, a δ -ALA-D tem ação constituinte de grupos prostéticos de importantes proteínas fisiológicas como a hemoglobina e os citocromos (SCHMATZ et al., 2012). Como referido

anteriormente, pela origem sulfidrílica da δ -ALA-D, os seus resíduos de cisteína são sensíveis a metais pesados - como os constituintes do cigarro - moléculas de oxigênio e outros agentes oxidantes que induzem a formação de ligações dissulfeto e levam à inibição enzimática (KADE et al., 2009).

Além da insuficiente produção do tetrapirrol heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do seu substrato δ -ALA no sangue, o qual está relacionado com a superprodução de EROs. O δ -ALA pode sofrer enolização e oxidação na presença de metais em pH fisiológico, produzindo radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (BECHARA et al., 1996; ROCHA et al., 2003). Trabalhos recentes têm indicado que em patologias associadas com o estresse oxidativo, tais como o câncer (GONÇALVES et al., 2005), a insuficiência renal crônica (SILVA et al., 2007) e o diabetes (KADE et al., 2009; SCHMATZ et al., 2012), ocorre uma inibição da atividade da δ -ALA-D, ao mesmo tempo que ocorrem danos oxidativos.

Na tentativa de reparar os efeitos nocivos das EROs os sistemas antioxidantes ganham destaque. Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, é qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração se comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, pode-se também definir antioxidantes como compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (VALKO et al., 2007). Esta definição engloba compostos de natureza enzimática e não enzimática (VALKO et al., 2007).

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

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

SOD é uma enzima mitocondrial tetramérica, apresentando um átomo de manganês por subunidade (SEIZI, 2003).

A SOD está presente em todos os organismos aeróbicos, cabendo a ela catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , que é menos reativo. O H_2O_2 gerado pela SOD agora poderá ser degradado por outras enzimas, como a CAT (Figura 14) (MCCORD; FRIDOVICH,1969; FARBER,1990).

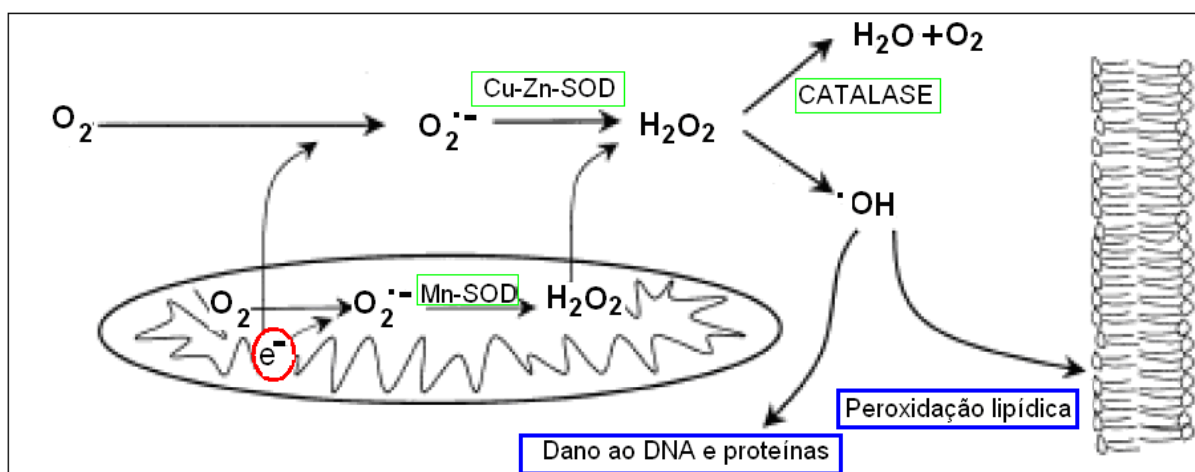


Figura 14 – Mecanismo enzimático antioxidante
Fonte: NORDBERG; ARNÉR (2001), com adaptações.

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

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, também possuem grande relevância no controle dos processos oxidativos os antioxidantes não enzimáticos. Sabe-se que o organismo tem a capacidade de produzir compostos que apresentam grande capacidade de defesa antioxidante, direta ou indireta, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). É especialmente importante destacar, entre os antioxidantes não enzimáticos, os compostos contendo grupos sulfidril (SH), chamados tióis, cuja capacidade para evitar a oxidação se deve, geralmente, ao átomo de enxofre que pode facilmente acomodar a perda de elétron para estabilizar um radical livre, sem tornar-se reativo (KAROUI et al., 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; MASELLA et al., 2005).

A glutathiona reduzida (GSH) é o tiol não-protéico mais abundante nas células animais (MEISTER; ANDERSON, 1983), sendo formada por cisteína, glicina e resíduos de ácido glutâmico e cuja capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH presente na cisteína. A GSH pode ser considerada, então, um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a dos processos de iniciação tumoral (VALKO et al., 2007), a literatura atual, contudo, tem destacado que o aumento dos níveis de glutathiona em pacientes com câncer pode estar associado a uma maior resistência dos tumores à quimioterapia, condição que poderia prejudicar o tratamento anticâncer desses pacientes (ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006; ZANINI et al., 2014).

Além dos tióis, outros antioxidantes não enzimáticos que destacamos nesse estudo são a vitamina C (VIT C) e a vitamina E (VIT E). A VIT C é um composto hidrossolúvel, presente em grande parte dos vegetais e frutos, e desempenha papel fundamental nas reações de oxi-redução nas células, agindo como um transportador de hidrogênio ou como um captador de moléculas isoladas de oxigênio (O₂). A vitamina C é amplamente utilizada na clínica médica, sendo importante no tratamento de patologias como o câncer. A VIT E, por sua vez, apresenta propriedades lipossolúveis e caracteriza-se por inibir a oxidação de lipídeos insaturados, funcionando como um doador de elétrons e, como tal, reage diretamente com os radicais livres. A VIT E atua sinergicamente com a glutathiona peroxidase, sendo dependente de selênio e da glutathiona, e com a VIT C, reduzindo a vitamina E oxidada e deixando-a novamente com ação antioxidante (ALMEIDA, 2008).

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

Neste contexto, considerando-se: a) o envolvimento dos processos inflamatórios no desenvolvimento do câncer; b) o importante potencial imunomodulador e tromborregulador desempenhado pelos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina; e c) a participação dos processos oxidativos celulares no desenvolvimento e na progressão das doenças neoplásicas, torna-se de

fundamental importância avaliar biomarcadores dos processos inflamatórios como as interleucinas; a atividade de ectonucleotidasas tais como a E-NTPDase, a ecto-5'-nucleotidase e a E-ADA, além de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com câncer de pulmão, uma vez que esses parâmetros estão amplamente envolvidos na fisiopatologia dessa doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Verificar a atividade de enzimas do sistema purinérgico e analisar biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com câncer de pulmão.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes com neoplasia pulmonar;
- ✓ Verificar a atividade da enzima E-NTPDase e a expressão do CD39 em plaquetas, bem como a agregação plaquetária de pacientes com câncer de pulmão;
- ✓ Determinar as atividades da E-NPP, da E-5'-nucleotidase e da E-ADA em plaquetas de pacientes com câncer de pulmão;
- ✓ Determinar a atividade da enzima δ -ALA-D eritrocitária dos pacientes com neoplasia pulmonar;
- ✓ Determinar os níveis de TBARS em plaquetas e os níveis de Espécies Reativas no soro dos pacientes com câncer de pulmão;
- ✓ Verificar a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT em plaquetas, assim como os níveis de antioxidantes não enzimáticos, tais como os tióis totais e tióis não protéicos em plaquetas, a VIT C no plasma e a VIT E no soro dos pacientes citados acima.

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta Tese estão apresentados sob a forma de um manuscrito e dois artigos publicados, os quais encontram-se no item “**MANUSCRITO E ARTIGOS**”. As seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências encontram-se nos próprios artigos e no manuscrito 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 apresentados no manuscrito e nos artigos contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

3 MANUSCRITO E ARTIGOS

3.1 Manuscrito

CYTOKINE SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH ADVANCED STAGE OF LUNG CANCER

Daniela Zanini^a; Luana Paula Pelinson^a; Viviane do Carmo Araújo Gonçalves^a; Cláudia Bertocelli dos Santos^a; Victor Camera Pimentel^a; Vera Maria Morsch^a, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a.

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

*Corresponding author:

Address correspondence and reprint requests to:

Daniela Zanini (dz_daniela@yahoo.com.br)

Tel: + 55-55-3220-9557

Fax: + 55 55 32208978

Maria Rosa Chitolina Schetinger (mariachitolina@gmail.com)

Tel: + 55-55-3220-9557

Fax: + 55 55 32208978

ABSTRACT

Objectives: Inflammation normally functions to maintain tissue homeostasis in response to tissue stressors such as infection or tissue damage. By contrast, chronic inflammation has been shown to contribute to development and progression of malignancies as cancer. By this reason, the aim of this study is to examine serum levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines such as Interleuckin (IL) 6, IL-17, IL-4, IL-2, IL-10, Interferon- γ (INF- γ) and Tumor Necrosis Factor (TNF) of patients with lung cancer in advanced stage of the disease, since these molecules are widely involved in different stages of carcinogenesis.

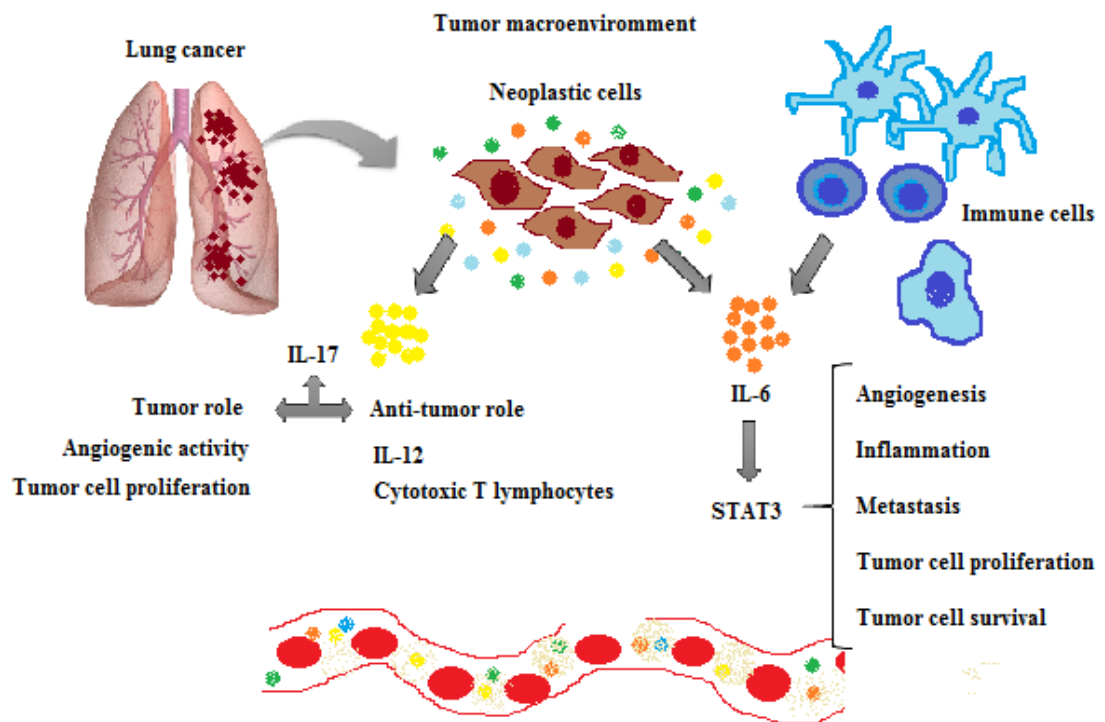
Methods: Blood samples were collected from patients (n=13) previously treated for lung cancer with chemotherapy. Patients were classified as stage IV according to the Union for International Cancer Control (UICC).

Results: Patients showed a significant increase in the IL-6 serum levels when compared to the control group. Furthermore, serum levels of IL-17 were significantly lower in patients with lung cancer when compared to the control group. Were not observed differences in the others cytokines levels between the patient group and the control group.

Conclusions: We can suggest that the increase in serum IL-6 may be contributing to the progression of lung cancer whereas the decreased levels of IL-17 may be a factor related to the advanced stage of the disease in these patients.

Keywords: Lung cancer; Inflammation; Cytokine; Interleuckin 6; Interleuckin 17.

ABSTRACT GRAPHICAL



INTRODUCTION

Lung cancer presents an incidence estimated at 1.4 million of new cases per year and has been the most common cancer in the world for over two decades [1, 2]. Approximately 80% of all lung cancer cases are non-small cell lung carcinoma (NSCLC), such as squamous cell carcinoma, adenocarcinoma or large cell carcinoma. Thus, NSCLC may be considered the leading cause of cancer death worldwide [3, 4].

The survival time of patients with NSCLC remains poor because lung cancer patients are typically diagnosed in the severe stage of the disease. The five-year survival rate is less than 15% even with combined treatment including surgery, chemotherapy, radiotherapy and targeted therapy, mostly because of the metastasis of lung cancer cells [3, 5].

There are various risk factors for lung cancer, including asbestos, radon, occupational exposure, environmental exposure and genetic factors [5]. However, since the report by Doll and Hill in 1950, tobacco smoking has been recognized as one of the most important risk factors for lung cancer, which accounts for 80% of the attributed risk among men and for 47% of the cases among women [6], which corroborates the incidence rates of lung cancer are generally higher among men than among women [5].

Cigarette smoking represents the best-known risk factor in lung cancer by promoting common pathogenic mechanisms such as oxidative stress and inflammation [7]. In this context, as early as 1863, Rudolf Virchow observed that tumor tissues are infiltrated by immune cells. He was also the first researcher to hypothesize a direct link between inflammation and cancer [8].

About 15% of human cancers are estimated to arise from sites of infection or chronic inflammation. Moreover, the majority of solid tumors exhibit infiltration by immune cells and release pathological levels of cytokines into the surrounding tissue and/or into the bloodstream [9]. The local effect of cytokines released into the tumor microenvironment has been reviewed extensively, showing to present an interaction that affects the tumor growth and the remodeling of the tumor microenvironment [9].

Since lung cancer remains a highly lethal disease, the alarming data on the incidence and mortality of lung cancer challenge researchers to propose mechanisms and elucidate factors involved in the development and progression of this destructive disease. Knowing that chronic inflammatory processes are intimately related to the development and progression of tumors, to verify serum levels of some cytokines as well as interleukin (IL) IL-6, IL-17, IL-4, IL-2, IL-10, Interferon- γ (INF- γ) and Tumor Necrosis Factor (TNF) from patients with lung cancer becomes extremely important to clarify some pathways involved in the pathophysiology of this malignancy.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Patient selection

The group of patients was composed of 13 individual diagnosed with lung cancer of non-small cell at the University Hospital of Santa Maria. Patients had stage IV of disease, according to Union for International Cancer Control (UICC) and were under treatment with antineoplastic cisplatin and gencitabine. Their blood sample was collected without an anticoagulant vacutainer tubes for serum obtation, when the patients had scheduled appointments in the field of Hematology/Oncology, University Hospital of Santa Maria. The control group was composed of 13 healthy individuals and with the same age of the patient group. All subjects gave written

informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria under the number 0061.0.243.000-10.

2.2 Haematological profile

The hematological profile as the erythrocyte count, hemoglobin levels, leukocyte and platelet count of patients with lung cancer, enrolled in this study, were obtained through the analysis of exams archived in medical folders of patients.

2.3 Blood serum samples

Blood was collected in vacutainer tubes without an anticoagulant system and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The precipitate was discarded and the serum was used to determine the cytokines levels.

2.4 Determination of cytokine levels in serum

The cytokines: IL-6, IL-17, IL-4, IL-2, IL-10, INF- γ and TNF, in the serum of the group of patients with lung cancer as well as of the control group were determined according to the method *Cytometric Bead Array (CBA)*, using specific kits to this method, as described for Morgan et al. [10].

2.5 Statistical analysis

For the statistical values, we used *t*-student test. Results were considered significant at $P \leq 0.05$ and are expressed as mean \pm standard deviation.

3 RESULTS

3.1 Patient characteristics

The classification of patients with lung cancer enrolled in this study regarding gender, age, antineoplastic drugs, classification of disease stage and data related to the smoking habits of patients with lung cancer is shown in Table 1. Most of the patients involved in this study were male (77 %), over 60 years old and all patients involved in this study were smokers and smoked cigarettes for at least 40 years. All the patients were diagnosed with lung cancer in stage IV, according to the Union for International Cancer Control (UICC). Regarding the control group, the average age was matched with the patients group, the subjects had no disease and were not smokers (data not show). Table 2 presents additional clinical data, such as erythrocyte count, hemoglobin levels, total leukocyte count and platelet count of the patients involved in this research.

3.2 IL-6, IL-17, IL-4, IL-2 serum levels

The IL-6, IL-17, IL-4, IL-2 serum levels are shown in Figure 1. We observed an increased in the IL-6 serum levels in lung cancer patients when compared with the control group ($P \leq 0.005$). A decreased of 27 % in the IL-17 serum levels in lung cancer patients was observed when compared with the control group ($P \leq 0.05$).

3.3 IL-10 serum level

To continue the study, we measured the levels of anti-inflammatory cytokine - IL-10. The level of IL-10 is show in Figure 2. No change in this parameter was observed between groups.

3.4 *INF- γ* and *TNF* serum levels

In addition, other inflammatory markers were also checked. *INF- γ* and *TNF* serum levels are shown in Figure 3. The levels of these cytokines were not significantly different between the group of patients with lung cancer and the control group.

4 DISCUSSION

Lung cancer is the leading cause of cancer morbidity and mortality worldwide, with almost 1.6 million new cases of lung cancer per year (13% of total cancer morbidity) and 1.4 million deaths per year (18% of total cancer mortality) [1]. The incidence of lung cancer in Brazil has increased in recent decades, and lung cancer mortality remains high, similar to what is seen in the rest of the world [5].

In Brazil, lung cancer is the leading cause of death from cancer among men and the second leading cause of cancer death among women, and despite the increasing incidence of the disease in women, lung cancer presents much more incident in men [5]. Closely related to the development of lung cancer is smoking and epidemiological evidence indicates that globally 1 billion men and 250 million women smoke every day [1].

This close association between smoking and the development of lung cancer can also be identified in our study, since all patients involved in this study smoked large quantity of cigarettes for at least 40 years. This characteristic was also observed in previous studies of our research group showing that the great majority of patients who had lung cancer had smoked for a long time [12-14]. Literature reports that approximately 87% of lung cancer cases are tobacco exposure-related and the

relative risk of developing lung cancer is 24 times higher among smokers than among nonsmokers [5].

Over 4.000 chemicals and as many as 60 carcinogenic substances have been identified in tobacco smoke. The main classes of carcinogenic compounds found in tobacco smoke include polycyclic hydrocarbons, such as benzopyrene, nitrosamines and aromatic amines [1]. These substances can promote damage to the deoxyribonucleic acid (DNA) by activating procarcinogenic compounds, inactivate tumor suppressor genes, promote angiogenesis and promote significant pro-inflammatory effects through the stimulation of the expression of the enzyme cyclooxygenase 2 (COX-2) in a wide variety of cells, such as T cells, lung cancer cells and cell squamous head and neck [15].

Chronic inflammation has been shown to contribute to tumorigenesis at all stages. It contributes to cancer initiation by generating genotoxic stress; to cancer promotion by inducing cellular proliferation, and to cancer progression by enhancing angiogenesis and tissue invasion [16]. In addition, studies suggest that tumor cells may modulate the immune response in their favor by the secretion of cytokines. Interleukin-6 (IL-6) is one of the best-characterized protumorigenic cytokine [17], wherein, the model proposed in 2008, by Chen et al., shows that the tumor cells, through the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, recruit immune cells to the tumor microenvironment and enable tumor progression through the production of cytokines [18].

Our study demonstrated that patients with lung cancer, in advanced stage of the disease, present higher levels of IL-6 when compared to the control group (Figure 1). This result is in accordance with the work cited above and other researchers which also showed increased levels of IL-6 in tumors such as breast

tumors and bone metastases [19], liver, pancreatic, gastric, colorectal and others [17].

The IL-6 plays an important role in angiogenesis and tumor invasion since this molecule induces activation of the oncogenic signal STAT3, resulting in prosurvival and proangiogenic gene upregulation. IL-6 is also an important regulator of cell survival, providing tumor cells with the ability to escape cell death induced by stress and cytotoxic drugs [17].

Besides the involvement of IL-6 in the development and progression of tumors, IL-17, the most important cytokine secreted by Th17 cells, plays a significant role in the immune response against viruses, extracellular bacteria and fungi, as well as in the pathogenesis of inflammatory diseases such as lung cancer [20]. In our study, we found a decrease in the serum levels of IL 17 in patients with lung cancer in stage IV of disease compared with the control group (Figure 1). IL-17 stimulates the production of inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-1 β , chemokines (CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8) in endothelial cells and cancer cells that may induce proliferation and chemotaxis of vascular endothelial cells, which promotes tumor growth. Furthermore, IL-17 influences the proliferation of tumor cells by the stimulation of new vessels formation due to its pro-inflammatory as well as angiogenic activities [20].

However, the functions of IL-17 in tumorigenesis are yet unclear. Some studies have shown that IL-17 may have anti-tumor action, since IL-17 stimulates the maturation of dendritic cells by increasing the surface expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules and the stimulation of production of IL-12 in macrophages, by IL-17, leading to the activation of cytotoxic T lymphocytes and thereby performing an anti-tumor role [20-22].

In agreement with our results, Wang et al. [23] showed a significant decrease in the percentage of Th17 cells in advanced stages of colorectal adenoma and colorectal carcinoma compared to that in healthy controls. Due to the fact that the Th17 cells are mainly responsible for the secretion of IL-17, the serum levels of IL-17 may be diminished because of the smaller number of Th17 cells in advanced stages of cancer, such as in the aforementioned study with colorectal cancer. This may also be occurring in our patients in view of the advanced stage of development of lung cancer.

Apart from the involvement of IL-6 and IL-17 in tumorigenesis, the IL-10 also presents important correlation with tumor development, despite of our results for the levels of IL-10 are not different between the patient and control group. Although the relationship between this IL and cancer has been studied extensively, the ultimate role of IL-10 in tumor biology remains unclear. The literature shows that IL-10 can favor tumor growth *in vitro* by stimulating cell proliferation and inhibiting cell apoptosis IL-10 but can also inhibit tumor-induced angiogenesis and enhance the production of tumor-toxic molecules [e.g., nitric oxide (NO)], which leads to tumor regression in some preclinical models [24].

In relation to INF- γ , this cytokine is an important protective factor against the development of tumors. The INF- γ exerts antitumor action by exert direct anti-proliferative and anti-metabolic effects on a wide variety of tumor cell, and other evidence indicates that at least some of the anti-tumor effects of INF- γ may be mediated through a mechanism involving inhibition of angiogenesis [25]. As our study showed no difference in the levels of INF- γ between the group of patients with lung cancer and the control group, this protective effect of INF- γ is not occurring satisfactorily.

In addition, the TNF is an extraordinarily pleiotropic cytokine with a central role in immune homeostasis, inflammation, and host defense. As can be seen in the results section, no differences in TNF level between patients and control group was observed in this study. However, it is worth noting that dependent on the cellular context, TNF can provide pro or antitumoral effects, since it can induce diverse effects such as apoptosis, necrosis, angiogenesis, immune cell activation, differentiation and cell migration. These processes are of great relevance in tumor immune surveillance and also play crucial roles in tumor development and tumor progression [26].

In summary, the influence of cytokines levels and inflammation on tumorigenesis is evidently significant. Therefore, verifying which cytokines may be contributing to the favoring tumor development, in patients with lung cancer in advanced stages, is of fundamental importance so that new strategies can be developed to prevent the advance of the disease.

5 CONCLUSIONS

For the first time it is demonstrated here that patients with NSCLC, in IV stage of disease, show alterations in the serum levels of IL-6 and IL-17. These changes are closely related to the development and tumor progression and are probably contributing to the process of tumorigenesis in the patients with lung cancer.

Acknowledgments

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

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

Table 1

Patient characteristics

	Men	Women
<i>Number of patients</i>	10 (77%)	3 (33%)
<i>Mean age</i>	68±14 years	61±9 years
<i>Medication</i>		
cisplatin and gencitabine	8 patients	1 patients
gencitabine	2 patients	2 patients
<i>Staging</i>		
IV	10 patients	3 patients
<i>Smokers</i>	10 patients	3 patients
<i>Duration of smoking</i>	45±3 years	40±2 years
<i>Cigarette consumption</i>	65±4 m/a*	49±5 m/a*

*m/a: packs per year

Table 2

Hematological profile of patients

Parameter	
Erythrocytes (million/mm³)	4,0 ± 0,20
Hemoglobin (g/dL)	11,1 ± 0,35
Hematocrit (%)	33,4 ± 1,25
HCM	30,1 ± 0,38
CHCM (g/dL)	32,8 ± 0,25
VCM (fL)	88,0 ± 1,20
RDW (%)	15,8 ± 0,34
Leukocytes (/μL)	8.900 ± 547
Platelets (/μL)	340.000 ± 28.900

In the table are the averages ± standard deviation of blood parameters observed in patients with lung cancer.

HCM: mean corpuscular hemoglobin; CHCM: Mean corpuscular hemoglobin concentration; VCM: mean corpuscular volume; RDW: Red Cell Distribution Width

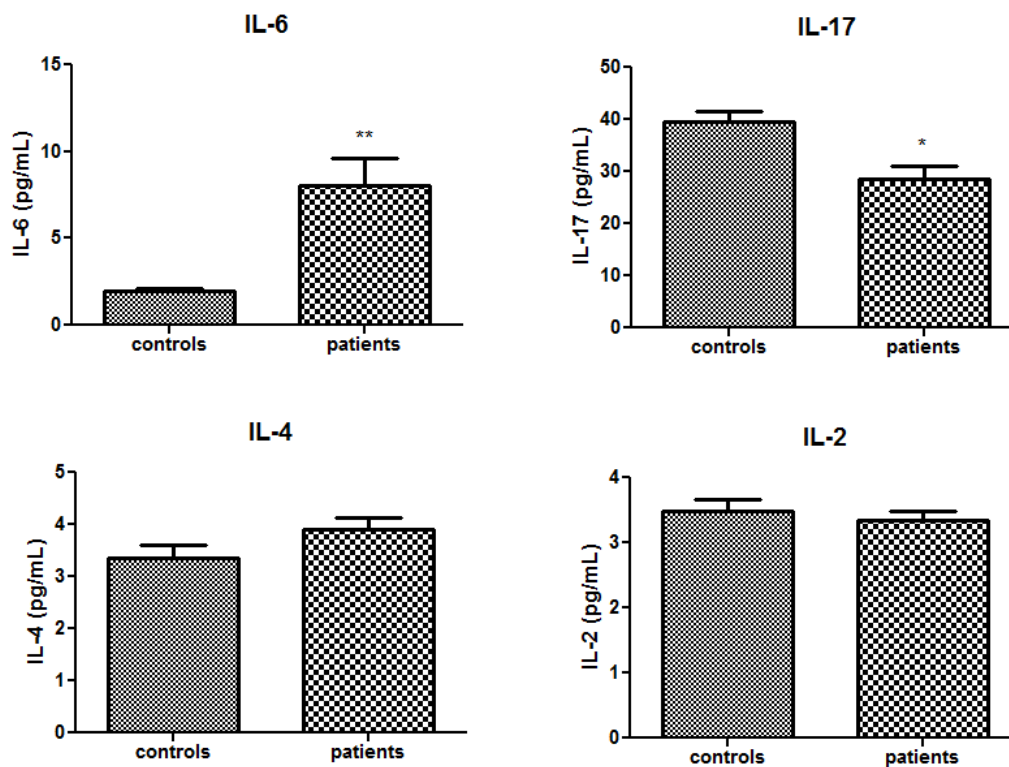


Figure 1. IL-6, IL-17, IL-4 and IL-2 serum levels of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=13). * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.005$

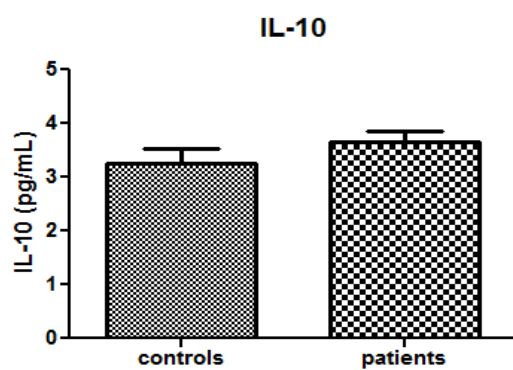


Figure 2. IL-10 serum levels of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=13)

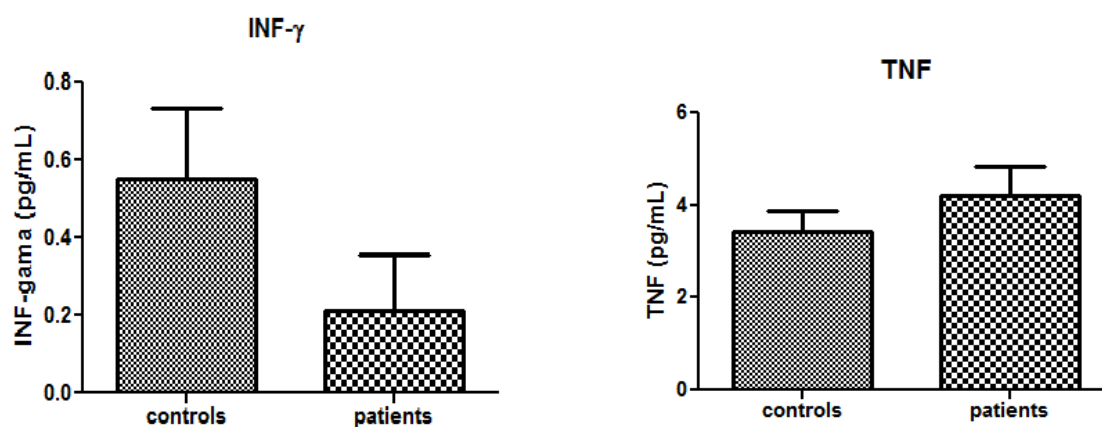


Figure 3. INF- γ and TNF serum levels of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=13)

REFERENCES

- [1] Yu Y, Liu H, Zheng S, et al. Gender susceptibility for cigarette smoking-attributable lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer* 2014; 85:351-360.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
- [3] Li Q, Han Y, Fei G, Guo Z, Ren T, Liu Z. IL-17 promoted metastasis of non-small-cell lung cancer cells. *Immunol Lett* 2012; 148:144-150.
- [4] Chen X, Wan J, Liu J, et al. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 2010; 69:348-354.
- [5] DUARTE RLDM, PASCHOAL MEM. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol* 2005; 32:56-65.
- [6] Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1355-1367.
- [7] Roca M, Roca IC, Mihaescu T. Lung cancer - a comorbidity in chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2012; 116:1055-1062.
- [8] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357:539-545.
- [9] Al-Zhoughbi W, Huang J, Paramasivan GS, et al. Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol* 2014; 41:281-295.
- [10] Morgan E, Varro R, Sepulveda H, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol* 2004; 110:252-266.
- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- [12] Zanini D, Schmatz R, Pimentel VC, et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2012; 66:40-45.
- [13] Zanini D, Schmatz R, Pelinson LP, et al. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. *Mol Cell Biochem* 2013; 374:137-148.
- [14] Zanini D, Pelinson LP, Schmatz R, et al. delta-aminolevulinatase dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2014; 68:603-609.
- [15] Huang RY, Chen GG. Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1815:158-169.

- [16] Chow MT, Moller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol* 2012; 22:23-32.
- [17] Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lymphpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol* 2014; 26:54-74.
- [18] Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 2008; 27:225-233.
- [19] Sotiriou C, Lacroix M, Lespagnard L, Larsimont D, Paesmans M, Body JJ. Interleukins-6 and -11 expression in primary breast cancer and subsequent development of bone metastases. *Cancer Lett* 2001; 169:87-95.
- [20] Karczmarczyk A, karp M, Giannopoulos K. The role of Th 17 cells in tumor immunity. *Acta Haematologica Polonica* 2014; 45:155-160.
- [21] Giannopoulos K, Schmitt M, Wlasiuk P, et al. The high frequency of T regulatory cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia is diminished through treatment with thalidomide. *Leukemia* 2008; 22:222-224.
- [22] Hus I, Bojarska-Junak A, Chocholska S, et al. Th17/IL-17A might play a protective role in chronic lymphocytic leukemia immunity. *PLoS One* 2013; 8:e78091.
- [23] Wang J, Xu K, Wu J, et al. The changes of Th17 cells and the related cytokines in the progression of human colorectal cancers. *BMC Cancer* 2012; 12:418.
- [24] Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005; 78:1043-1051.
- [25] Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoeediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:95-109.
- [26] Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ* 2009; 49:1-15.

3.2 Artigo 1

Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets

Daniela Zanini, Roberta Schmatz, Victor Camera Pimentel, Jessié Martins Gutierrez, Paula Acosta Maldonado, Gustavo Roberto Thomé, Andréia Machado Cardoso, Naiara Stefanello, Liliane Oliveira, Juarez Chiesa, Daniela Bitencourt Rosa Leal, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger

Publicado na Revista Biomedicine & Pharmacotherapy



Available online at
SciVerse ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com/en



Original article

Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets

Daniela Zanini^a, Roberta Schmatz^a, Victor Camera Pimentel^a, Jessié Martins Gutierrez^a,
 Paula Acosta Maldonado^a, Gustavo Roberto Thomé^a, Andréia Machado Cardoso^a,
 Naiara Stefanello^a, Liliane Oliveira^b, Juarez Chiesa^b, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a,
 Vera Maria Morsch^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a,*}

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

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

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 6 June 2011
 Accepted 28 September 2011

Keywords:
 Lung neoplasm
 NTPDase
 Ectonucleotide pyrophosphatase/
 phosphodiesterase
 5'-nucleotidase
 Adenosine deaminase

ABSTRACT

Background: The nucleotides and nucleosides of adenine are signaling molecules related to thromboregulation and modulation of immune responses in patients with malignancies. Thus, this study aims to determine NTPDase, 5'-nucleotidase, ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in the platelets of patients with lung cancer.

Methods: We collected blood samples from patients (n = 33) previously treated for lung cancer with chemotherapy. Patients were classified as stage IIIb and IV according to the Union for International Cancer Control (UICC).

Results: Patients showed a significant decrease in the hydrolysis of adenosine diphosphate (ADP) and adenosine, whereas the adenosine monophosphate (AMP) hydrolysis and platelet aggregation were significantly increased in this group. Adenosine triphosphate (ATP) hydrolysis did not show significant results between the group of patients and the control group.

Conclusions: We may suggest that ectonucleotidases as well as ADA are enzymes involved in thromboembolic events but especially here we may see that they are also directly involved in the generation of adenosine formation in the cancer patient circulation.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The number of cancer cases has increased significantly, mainly from the last century, becoming one of the most important public health problems worldwide [1]. Lung cancer, a rare disease in the early 20th century, has become the most deadly neoplastic disease in the world [2].

Lung cancer is a disease with uniform behavior because it includes several histological types with different biological activity and aggressiveness. The major subdivision proposal for lung cancer is between undifferentiated carcinoma and small cell carcinoma non-small cell, which is the most frequent in the population [3].

Patients affected by neoplastic diseases present a series of physiological changes, including the occurrence of thrombotic and inflammatory processes. The adenine nucleotides ATP, ADP and AMP and their corresponding nucleoside, adenosine, are signaling molecules related to thromboregulation and modulation of

immune responses [4,5]. Thus, to verify the activity of the enzymes responsible for the degradation of these nucleotides in the extracellular environment is of paramount importance.

Associations between cancer and venous thromboembolic processes have been reported in medical literature [6]. According to Donati and Falanga, cancer patients may exhibit increased platelet activation, and the NTPDase (EC 3.6.1.5, CD39), which is a membrane-bound enzyme in platelets, is closely linked to this process.

NTPDase is responsible for the hydrolysis of ATP and ADP to AMP and it plays an important role in controlling blood flow by regulating the catabolism of ADP. Moreover, it is known that micromolar concentrations of ADP are sufficient to induce platelet aggregation in humans [7]. ATP, at high concentrations, is a competitive inhibitor of the actions mediated by ADP [8] and presents proinflammatory functions through the stimulation and proliferation of lymphocytes as well [9].

Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP-EC 3.1.4.1) plays various physiological roles, highlighting the recycling of nucleotides, regulation of extracellular pyrophosphate and stimulation of cell motility [10]. Currently, it is described as a

* Corresponding author. Tel.: +55-55-3220-9557; fax: +55 55 32208978.
 E-mail address: mariachitolina@gmail.com (M.R.C. Schetinger).

new focus within the purinergic signaling in the control of platelet activation because it is located together with the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase on the surface of these cells. Thus, the E-NPP enzyme is also involved in the hydrolysis of ATP and ADP, leading to the production of nucleotide monophosphate [11].

The enzyme 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) hydrolyzes AMP generating adenosine and thus completing the metabolism of ATP [12]. Adenosine is a potent inhibitor of platelet aggregation and an important modulator of vascular tone [13]. It acts as a protective agent in tissues, playing a vital role in the immune system by promoting the maturation of monocytes [14,15]. Furthermore, adenosine has potent antiinflammatory and immunosuppressive activities by inhibiting the proliferation of T cells through the activation of A2A receptors and release of proinflammatory cytokines [16].

However, there is controversy about the beneficial effects of adenosine. There are reports in the literature showing that adenosine has procarcinogenic properties, among which are the functions that promote growth and stimulation of angiogenesis, which may further aggravate the state of health of patients who have lung cancer [9,15].

It is also known that adenosine is inactivated in the extracellular medium by the action of adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4, CD26), which catalyzes the irreversible deamination of adenosine to inosine [17].

Together, the ectoenzymes described above are capable of regulating the extracellular concentration of adenine nucleotides and nucleosides, which are important both in maintaining blood homeostasis through the regulation of platelet aggregation [18] and in controlling inflammatory processes.

Taking into account the close relation between the thromboembolic processes and neoplastic diseases we aimed to evaluate, for the first time, the lung cancer effect on NTPDase, E-NPP, 5'-nucleotidase and ADA activities from the purinergic system.

2. Materials 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

Patients included in this study were diagnosed with lung cancer of non-small cell at the University Hospital of Santa Maria. Patients had stage IIIb and IV disease, according to Union for International Cancer Control (UICC) and were being treated with antineoplastic cisplatin and gencitabine. This group consisted of 33 individuals and the blood sample was collected in citrated and EDTA vacutainer tubes, when the patients had scheduled appointments in the field of Hematology/Oncology, University Hospital of Santa Maria. The control group was composed of 33 healthy individuals and with the same age patient group. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria under the number 0061.0.243.000-10 and all the patients signed a written consent.

2.3. Platelet aggregation

The platelet aggregation profile was performed in a Chrono-LOG aggregometer using ADP (2.5 and 5 μ M) as agonist. Results were expressed as percentage of aggregation.

2.4. Platelet rich plasma preparation (PRP)

PRP was prepared according to Pilla et al. [19], with minor modifications. Briefly, the blood was collected in 0.129 M citrated vacutainer tubes and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. After this, the PRP was centrifuged at 3500 rpm for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, which contained 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and the protein was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL for the determination of ectonucleotidase activities. The integrity of the platelet preparation was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity using the labtest kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

2.5. NTPDase and 5'-nucleotidase activity determination

Ectonucleotidase activities were determined using a PRP preparation according to Pilla et al. [19]. Briefly, to determine NTPDase activity, 20 μ L of PRP preparation was added to the system mixture, which contained 5 mM CaCl₂, 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 μ L of ATP or ADP (1 mM) as substrate. For AMP hydrolysis, 5'-nucleotidase activity was determined as described above, except that 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂ and the nucleotide added was 2 mM AMP. Both reactions were stopped by the addition of 200 μ L 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. [20] using KH₂PO₄ as standard. The same process was carried out in control tubes to exclude non-enzymatic hydrolysis, by adding 20 μ L of protein to the reaction medium after TCA. Results were expressed as nmol inorganic phosphate released/minute/milligram of protein (nmol Pi/min/mg protein).

2.6. Ecto-NPP activity determination - measurement of p-Nph-5'-TMP hydrolysis in platelets

E-NPP activity, from platelets, was assessed using p-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (p-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. [11]. The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, and 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 μ L. 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 μ L 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 $\times 10^{-3}$ M/cm.

2.7. Adenosine deaminase activity determination

ADA, in platelets, was determined according to Guisti and Galanti [21]. Briefly, 50 μ L of serum or platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. 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; 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.

When the NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities were tested in vitro in the presence of cisplatin and gencitabine drugs, the drugs were diluted in 100% water, to a final concentration according to bioavailability, and added to the assay tubes.

2.8. Expression of NTPDase in blood platelets

Peripheral blood, collected in EDTA, was incubated with monoclonal antibodies (MAb) conjugated with fluorescein isothiocyanate (anti-CD61 FITC) and phycoerythrin (anti-CD39 PE) by a double-staining combination. For the immunophenotypic studies, the samples were stained and the lyse/wash technique was used (the amount of blood and MAb reagents was in accordance with manufacturer recommendations). The erythrocyte lysis was carried out using FACS lysing solution (Becton Dickinson (BD), San Jose, CA, USA). The cells were washed with PBS and finally, resuspended in PBS buffer. After, they were immediately analyzed by a FACSCalibur cytometer (BD), using CellQuest (BD) software program.

In the CD61+ population, the presence of CD39 in platelets was confirmed and the results expressed in relative values.

2.9. Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method according to Bradford [22] using bovine serum albumin as standard.

2.10. Statistical analysis

For the statistical values, we used *t*-Student test. The results were considered significant at $P \leq 0.05$ and are expressed as mean \pm SD.

3. Results

3.1. Patient characteristics

The classification of patients with lung cancer enrolled in this study regarding gender, age, antineoplastic drugs and classification of disease stage are shown in Table 1.

3.2. Platelet aggregation

Platelet aggregation using ADP at 2.5 μ M did not change significantly between the patient and control groups. However, when ADP was used at 5 μ M, platelet aggregation was significantly higher in patients compared with the control group (Table 2).

3.3. NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities in the presence of cisplatin and gencitabine

No changes were observed in the enzymatic activity of NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA, in the presence of the

Table 1
Patient characteristics.

	Men	Women
Number of patients	21 (64%)	12 (36%)
Mean age	67 \pm 16 years	62 \pm 13 years
Medication		
Cisplatin and gencitabine	14 patients	3 patients
Gencitabine	7 patients	9 patients
Staging		
IIIb	4 patients	3 patients
IV	17 patients	9 patients

antineoplastic drugs cisplatin and gencitabine, in plasma concentrations achievable during their use, when tested on platelets from control individuals (Table 3).

Table 2
Platelet aggregation profile.

Agonist	Control	Patients
ADP (2.5 μ M)	52.30 \pm 3.15	54.00 \pm 4.24
ADP (5.0 μ M)	55.64 \pm 3.24	68.10 \pm 4.87 ^a

Results are expressed as percentage of aggregation.

^a Significantly increase compared with the control.

Table 3
Effect of drugs on NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities in platelets from control individuals.

Drug (μ g/mL)	NTPDase ATP	NTPDase ADP	5'-nucleotidase AMP	E-NPP	ADA
<i>Cisplatin</i>					
0	17.9 \pm 8.9	13.3 \pm 4.5	4.8 \pm 2.3	1.6 \pm 0.1	5.0 \pm 0.4
0.005	14.0 \pm 8.7	8.9 \pm 1.8	6.8 \pm 0.3	1.0 \pm 0.1	4.3 \pm 1.2
0.01	18.8 \pm 5.3	13.9 \pm 5.4	6.6 \pm 2.7	2.0 \pm 0.1	4.7 \pm 0.8
0.02	22.5 \pm 7.4	13.2 \pm 4.9	2.8 \pm 1.3	1.7 \pm 0.1	4.6 \pm 0.9
<i>Gencitabine</i>					
0	17.9 \pm 8.9	13.3 \pm 4.5	4.8 \pm 2.3	1.6 \pm 0.1	5.0 \pm 0.4
10	16.1 \pm 4.9	11.8 \pm 0.6	4.1 \pm 1.6	1.8 \pm 0.2	3.4 \pm 0.4
20	15.3 \pm 9.1	11.2 \pm 2.3	7.0 \pm 0.5	1.6 \pm 0.1	3.2 \pm 0.5
40	18.8 \pm 12.8	15.7 \pm 8.3	6.5 \pm 2.7	1.9 \pm 0.1	4.1 \pm 0.3

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

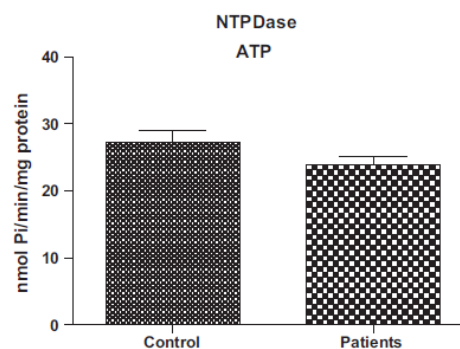


Fig. 1. NTPDase activity in the platelets of patients with lung cancer using ATP as substrate. Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 33$).

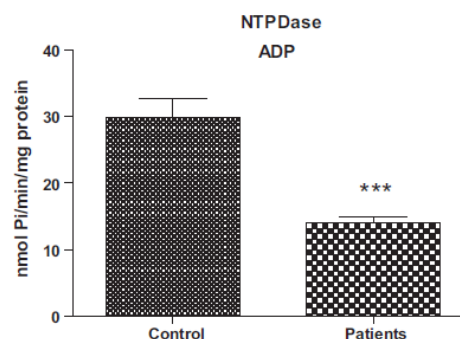


Fig. 2. NTPDase activity in the platelets of patients with lung cancer using ADP as substrate. Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 33$).

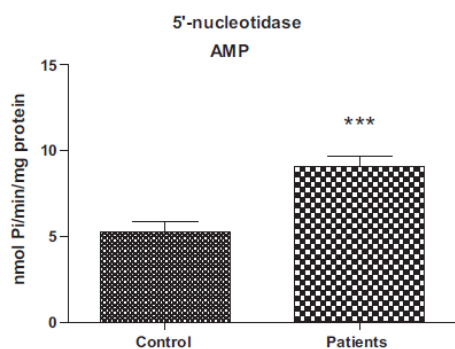


Fig. 3. 5'-nucleotidase activity in the platelets of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 33$).

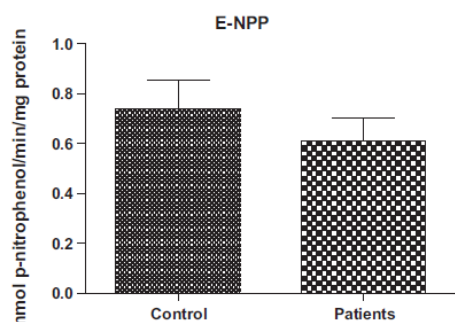


Fig. 4. E-NPP activity in the platelets of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 33$).

3.4. ATP, ADP, AMP and adenosine hydrolysis

The results described here are from *t*-Student test. LDH revealed that almost 4% of the platelets were disrupted indicating that the preparation was predominantly intact (data not shown).

Fig. 1 shows NTPDase activity using ATP as substrate. No significant differences between the control and patient groups were observed ($P \leq 0.05$).

The NTPDase activity using ADP with substrate is shown in Fig. 2. As can be observed a significant decrease in the ADP

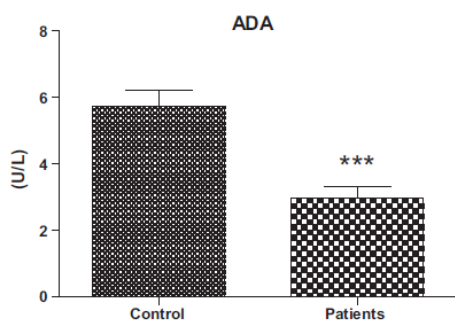


Fig. 5. ADA activity in the platelets of patients with lung cancer. The results were expressed as mean \pm standard deviation ($n = 33$).

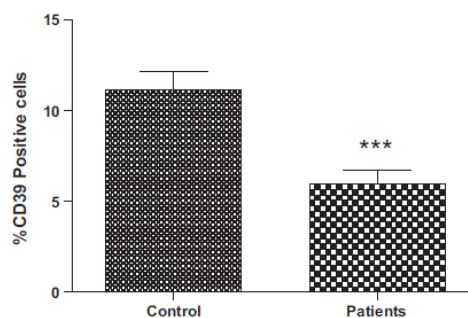


Fig. 6. Percentage of CD39 positive cells from patients with lung cancer ($n = 10$) when compared to the control group ($n = 10$). The results were expressed as mean \pm standard deviation.

hydrolysis in the patient group was observed compared with the control group ($P \leq 0.05$).

AMP hydrolysis was significantly increased in patients when compared with the control group (Fig. 3) ($P \leq 0.05$).

The E-NPP activity showed no significant difference between control group and the patient group (Fig. 4) ($P \leq 0.05$).

ADA activity was significantly decreased in patients compared with the control group (Fig. 5) ($P \leq 0.05$).

3.5. CD39 expression

The percentage of CD39 positive cells from lung cancer patients was significantly decreased compared with the control group (Fig. 6) ($P \leq 0.05$).

4. Discussion and conclusion

Lung cancer is the most common neoplastic disease in terms of both incidence and mortality worldwide [23]. Patients affected by neoplastic diseases may present thrombotic and inflammatory processes. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides and nucleosides are involved in controlling these processes [24]. In this sense, we aimed to investigate the activity of such enzymes in patients with lung cancer.

Results showed that the incidence of lung cancer is higher in men than in women, which is in accordance with some other studies [23,25] (Table 1). Another important aspect observed in this study which corroborates with the main risk factor for developing lung cancer indicated in the literature was that all patients who participated in the research were cigarette smokers [26]. These patients on average smoked at least 20 cigarettes per day for 46 years.

Results here clearly demonstrate that the hydrolysis of nucleotides by platelets is changed in lung cancer patients. Our research group has also found changes in the hydrolysis of adenine nucleotides in several pathological conditions including in breast cancer, prostate cancer, and uterine cervix neoplasia [5].

In the present study, the ATP hydrolysis was not altered while the ADP hydrolysis was decreased. Similar results were verified by our research group, for the ADP hydrolysis, in patients with breast cancer, uterine cervical neoplasia patients and in some stages of acute lymphoblastic leukemia patients [5]. These results reinforce the close relationship between the neoplastic diseases and enzymes that hydrolyze adenine nucleotides activity.

A decrease of ADP hydrolysis favors the accumulation of this nucleotide in the extracellular environment that can promote an illicit platelet aggregation in lung cancer patients since this

nucleotide is directly involved in recruiting platelets from the circulation as well as it is involved in amplifying the platelet aggregation phenomenon [27,28]. On the other hand, no changes in the hydrolysis of ATP could be a compensatory mechanism evoked by the body with the objective to prevent platelet aggregation, taking into account that the concentration of ADP is increased and it is a potent pro-aggregator agent [29].

As it is known, literature shows that cancer patients are predisposed to have thromboembolic alterations, which may be a consequence of this decreased hydrolysis [30].

In addition to the decrease in ADP hydrolysis found in this research, platelet aggregation also showed a significant increase in patients with lung cancer compared with the control group when 5.0 μ M ADP was used as agonist (Table 2).

De Cicco [31] has showed coagulation abnormalities in cancer reporting that over 50% of the patients with malignancy and up to 90% of those with metastasis presented coagulation abnormalities. We can suggest that this increase in platelet aggregation may be due to the accumulation of ADP on the extracellular medium found in this study.

Literature data indicate that adenine nucleotides and adenosine have an important role in tumor growth [15,32]. Munson et al. [33] suggested that platelets may secrete growth factors that could stimulate cancer proliferation, thus, we can suggest that ADP induce platelet activation in patients with lung cancer, which may promote further tumor development.

In relation to platelet CD39 expression, a decrease in the lung cancer patient group was found. These results are in accordance with the reduction observed in NTPDase activity, when ADP was used as substrate in these patients.

Another important aspect to be discussed in this study is an increase in 5'-nucleotidase activity observed in lung cancer patients. This increase was also found in previous studies with breast cancer patients on the stage II [5] and this result can indicate a possible enhancement in adenosine formation, which is perfectly plausible as a reflection of the tumor presence and, as it is well known, adenosine acts as a tumor promoting agent [34].

As we already described, adenosine, produced by ecto-5'-nucleotidase, has many functions that favor tumor development. It may, for example, stimulate angiogenesis in hypoxic solid tumors. This effect results from the fact that it stimulates the proliferation of human endothelial cells and the expression of the vascular endothelial growth factor [9,15]. In addition, hypoxia, resulting from the tumor presence, may increase the expression of the enzyme which generates adenosine [35].

The decreased ADA activity found in this study also corroborates with the hypotheses described above, since this enzyme is directly involved in adenosine degradation generating inosine. Szychala and Kitajewski [36] suggested that the increase in the generation of adenosine by tumors could be correlated with the development of drug resistance and with a more aggressive course of the disease.

In order to exclude a direct effect of drugs used by patients with lung cancer, in this study, we also tested NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities *in vitro* in the presence of drugs such as cisplatin (0.005, 0.01 and 0.02 μ g/mL) and gencitabine (10, 20 and 40 μ g/mL). All concentrations used *in vitro* represented, approximately, the mean plasma values of the medications and the drugs were tested on platelets from control individuals. The results obtained demonstrate that NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP and ADA activities were not affected by the presence of the medications at the concentrations cited above (Table 3).

Taken together, these results may suggest that ectonucleotidases as well as ADA are enzymes involved in all the thromboembolic events caused by different mechanisms, but specially here, we may see that they are directly involved in not only illicit platelet

aggregation but also in the generation of adenosine formation in cancer patient's circulation. This study is of great importance to elucidate some of the mechanisms involved in the hydrolysis of adenine nucleotides and nucleosides in patients with lung cancer, however, further studies are needed to fully understand the involvement of purinergic system in the development of complications in malignant processes.

For the first time, it is demonstrated here that lung cancer exerts a remarkable alteration in enzymes that hydrolyze adenine nucleotides and nucleosides. These findings suggest not only the role displayed by these molecules on the circulation but also the expanding role of such enzymes as a future tool in the control of coagulation disorders.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgments

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

References

- [1] Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Riscos de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol* 2005;51:227–34.
- [2] Wang Y, Yang H, Li L, Wang H, Zhang C, Yin G, et al. Association between CYP2E1 genetic polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2010;46:758–64.
- [3] Uehara C, Jamnik S, Santoro IL. Câncer de pulmão, Medicina. Ribeirão Preto, 1998.
- [4] Burnstock G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signaling. *Clin Med* 2002;2:45–53.
- [5] Schetinger MRC, Morsch VM, Bonan CD, Wyse ATS. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 2007;31:77–98.
- [6] Donati MB, Falanga A. Pathogenetic mechanisms of thrombosis in malignancy. *Acta Haematol* 2001;106:18–24.
- [7] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 2003;1:2497–509.
- [8] Rozalski M, Nocol M, Watala C. Adenosina diphosphate receptors on blood platelets – potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochim Pol* 2005;52:411–5.
- [9] Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Gagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Therap* 2006;112:358–404.
- [10] Goding JW, Grobbee B, Slegers H. Physiological and pathological functions of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 2003;1638:1–19.
- [11] Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-Chaves MLM, Sarkis JFF. Ectonucleotide 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.
- [12] Barankiewicz J, Danks AM, Abushanab E, Makings L, Wiemann T, Wallis RA, et al. Regulation of adenosine concentration and cytoprotective effects of novel reversible adenosine deaminase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:1230–8.
- [13] Anfossi G, Russo I, Massucco P, Mattiello L, Cavalot F, Balbo A, et al. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. *Thromb Res* 2002;105:71–8.
- [14] Fischer D, Van der Weyden MB, Snyderman R, Kelley WN. A role for adenosine deaminase in monocyte maturation. *J Clin Invest* 1976;58:399–407.
- [15] Szychala J. Tumor promoting functions of adenosine. *Pharmacol Therap* 2000;87:161–73.
- [16] Gessi K, Varani S, Merighi S. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signalling* 2007;3:109–16.
- [17] Blackburn MR, Kellems RE. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv Immunol* 2005;86:1–41.
- [18] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Mol Cell Res* 2008;1758:673–94.
- [19] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JFF. ATP diphosphohydrolyase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225–30.

- [20] Chan K, Delfert K, Jungner KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375–80.
- [21] Guisti G, Galanti B. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 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;72:218–54.
- [23] De Cos Escuin JS. El cáncer de pulmón en España. *Epidemiología, supervivencia y tratamiento actuales*. *Arch Bronconeumol* 2009;45:341–8.
- [24] Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006;2:409–30.
- [25] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277–300.
- [26] Cote ML, Chen W, Smith DW, Benhamou S, Bouchardy C, Butkiewicz D, et al. Meta-and pooled analysis of GSTP1 polymorphism and lung cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2009;169:802–14.
- [27] Enjyoji K, Sévigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Am Esch II, et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Med* 1999;5:1010–7.
- [28] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Islam N, Pinsky DJ, Gayle R, et al. Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:178–82.
- [29] Birk AV, Bubman D, Broekman MJ, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, et al. Role of a novel soluble nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. *J Lab Clin Med* 2002;139:116–24.
- [30] Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. *Lancet Oncol* 2005;6:401–10.
- [31] De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:187–96.
- [32] Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi GP, et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 2003;100:31–48.
- [33] Munson L, Upadhyaya NB, Meter SV. Platelet-derived growth factor promotes endometrial epithelial cell proliferation. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1820–5.
- [34] Maldonado PA, Negrini LA, Ethur JS, Oliveira L, Corrêa MC, Becker LV, et al. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. *Biomed Pharmacother* 2010;64:499–504.
- [35] Hunsuckera SA, Mitchella BS, Spychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther* 2005;107:1–30.
- [36] Spychala J, Kitajewski J. Wnt and β -catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Exp Cell Res* 2004;296:99–108.

3.3 Artigo 2

δ-aminolevulinate dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress

Daniela Zanini, Luana Paula Pelinson, Roberta Schmatz, Luciane Belmonte Pereira, Caroline Curry Martins, Jucimara Baldissareli, Guilherme Pires Amaral, Félix Alexandre Antunes Soares, Luiz Gustavo Brenner Reetz, Maria do Carmo Araújo, Juarez Chiesa, Vera Maria Morsch, Daniela Bitencourt Rosa Leal, Maria Rosa Chitolina Schetinger

Publicado na Revista Biomedicine & Pharmacotherapy



Available online at
ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com/en



Original Article

δ -aminolevulinate dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress



Daniela Zanini ^{a,*}, Luana Paula Pelinson ^a, Roberta Schmatz ^a, Luciane Belmonte Pereira ^a,
 Caroline Curry Martins ^a, Jucimara Baldissareli ^a, Guilherme Pires Amaral ^a,
 Félix Alexandre Antunes Soares ^a, Luiz Gustavo Brenner Reetz ^b, Maria do Carmo Araújo ^b,
 Juarez Chiesa ^b, Vera Maria Morsch ^a, Daniela Bitencourt Rosa Leal ^a,
 Maria Rosa Chitolina Schetinger ^{a,*}

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

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

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 23 March 2014
 Accepted 16 April 2014

Keywords:
 Lung cancer
 δ -Aminolevulinate dehydratase
 Oxidative stress
 Antioxidants

ABSTRACT

This study investigated the δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity in whole blood as well as the parameters of oxidative stress, such as reactive species (RS) levels in serum, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, as well as total thiols (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) levels in platelets. Moreover, the content of vitamin C and E in plasma and serum, respectively, in lung cancer patients was also investigated. We collected blood samples from patients ($n = 28$) previously treated for lung cancer with chemotherapy. Patients were classified as stage IIIb and IV according to the Union for International Cancer Control (UICC). Results showed a decrease of 37% in δ -ALA-D activity in patients with lung cancer when compared to the control group. RS and TBARS levels were 8% and 99% higher in the patient group, respectively. The activity of SOD and CAT as well as the vitamin C content were 41%, 35% and 127% lower in patients when compared with controls, respectively. However, T-SH and vitamin E levels were 27% and 44% higher in lung cancer patients, respectively. Results show that the overproduction of reactive species in patients with lung cancer may be interfering with the activity of δ -ALA-D. Likewise, the decrease in the activity of this enzyme may be contributing for the oxidative stress.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Lung cancer remains the leading cause of cancer death in men and women. Moreover, according to the estimates for 2014, it will be the second most commonly diagnosed cancer in men and in women, trailing only the diagnosis of prostate cancer and breast cancer, respectively [1].

Considering the high incidence and mortality caused by lung cancer in the world population, to deepen the knowledge regarding the biochemical changes caused by this serious disease is of fundamental importance. It is important to point out that the

process of carcinogenesis includes multiple molecular and cellular events that promote the transformation of a normal cell into a malignant neoplastic cell.

According to Klaunig and Kamendulis [2], evidence points at least three steps to the occurrence of the carcinogenic process: initiation, promotion and tumor progression, being that the oxidative stress is involved directly in these steps for tumor development.

In view of this, several studies, including from our research group, have shown the involvement of oxidative stress in the development and progression of cancer [3–5]. Oxidative stress is a state of imbalance between the production of free radicals, especially reactive species (RS), and the ability of the body defense against these species. When there is a favoring in the production of RS, a characteristic scenario of oxidative stress is installed, which promotes the progressive transformation of cells to a malignant

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 9557; fax: +55 55 32208978.
 E-mail addresses: dz.daniela@yahoo.com.br (D. Zanini),
 mariachitolina@gmail.com (M.R.C. Schetinger).

form, providing an increased frequency of mutations by DNA damage and, consequently, an increased risk of tumorigenesis [6–8].

RS have the potential to cause irreversible damage to important biomolecules, such as membrane lipids, proteins and DNA through their ability to induce biochemical changes [9,10]. This way, these changes may alter the functioning of some structures, such as platelets, and consequently affect the activity of enzymes anchored in their membranes.

It is important to note that tumor cells, in turn, are known to be primarily responsible for the production and release of RS in circulation [2]. Thus, several mechanisms, which lead to oxidative stress, have been proposed in patients with cancer, including alterations in energy metabolism [11], chronic non-specific inflammation [12], and, finally, the use of anticancer drugs [11].

It is not yet well established whether oxidative stress observed in tumor cells results in increased production of oxidants or failures in defense mechanisms [3]. However, it is important to remember that tumor cells are often hypoxic [13], and this oxygen deprivation may alter the regulation of their enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses.

Closely related to oxidative stress is the activity of the enzyme δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24). It is a sulfhydryl-containing enzyme extremely sensitive to oxidizing agents [14], which plays a fundamental role in most of the live aerobic organisms by participating in heme biosynthesis. δ -ALA-D catalyzes the asymmetric condensation of two molecules of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) to form the monopyrrole porphobilinogen (PBG). In subsequent steps, PBG is assembled into tetrapyrrole molecules, which constitute the prosthetic groups of physiologically significant proteins, such as hemoglobin, cytochromes and enzymes, such as catalase [15–17]. δ -ALA-D is responsive to situations associated with oxidative stress, and its inhibition may lead to δ -ALA accumulation in blood, which, in turn, may intensify the oxidative stress by generating reactive species [18]. The decreased activity of δ -ALA-D has already been reported in several pathologies, including cervical cancer in women [19]. However, there is no information concerning the δ -ALA-D activity from lung cancer subjects.

Therefore, the aim of this study was to investigate the activity of δ -ALA-D due to its sensitivity to oxidative conditions and oxidative stress parameters in patients with lung cancer.

2. Materials and methods

2.1. Materials

δ -ALA, 2-thiobarbituric acid (TBA), dithiothreitol (DTT), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) were purchased from Sigma (Saint-Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Study population

Patients included in this study were diagnosed with lung cancer of non-small cells at the University Hospital of Santa Maria. The patients had disease in stages IIIb and IV according to Union for International Cancer Control (UICC) and were being treated with antineoplastic cisplatin and gemcitabine. This group consisted of 28 individuals with 60 years old, on average, who had no other comorbidities, such as diabetes. A blood sample was collected when the patients had medical appointments in the field of Hematology/Oncology at the University Hospital of Santa Maria. The sample was collected in heparin, EDTA, citrate and without anticoagulant vacutainer tubes. The control group was composed

of 28 non-smokers healthy individuals, 58 years old, on average, who had no comorbidities. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria under the number 0061.0.243.000-10 and all the patients signed a written consent.

2.3. δ -ALA-D activity

δ -ALA-D activity was assayed in whole blood by the method of Sassa et al. [16]. The enzyme reaction was started after 10 min of blood pre-incubation. The reaction was started by adding δ -ALA to a final concentration of 4 mM in a phosphate buffered solution. The incubation was carried out for 2 h at 39 °C, and the reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt. Results were expressed in nmol PBG/h/mg protein.

2.4. Platelet rich plasma preparation (PRP)

PRP was carried out according to Pilla et al. [20] with minor modifications. Briefly, the blood was collected into 0.129 M citrated vacutainer tubes and centrifuged at 1000 rpm for 15 min. After this, the PRP was centrifuged at 3500 rpm for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, which contained 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and the protein was adjusted to 0.6–0.8 mg/mL for the determination of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, as well as for the determination of lipid peroxidation and levels of total thiols (T-SH) and non-protein thiols (NPSH).

2.5. Blood serum and plasma separated

Blood was collected in vacutainer tubes without an anticoagulant system for serum, and plasma was collected in vacutainer tubes with EDTA. Serum and the plasma were separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. The serum was used to determine the vitamin E (VITE) levels, and plasma was used to determine vitamin C (VIT C) levels.

2.6. Determination of lipid peroxidation in platelets

Lipid peroxidation was estimated by measuring thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in platelet samples according to Olas et al. [21] with some modifications. Briefly, 50 μL of platelets was incubated with equal volume of water, with addition of 400 μL of 15% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) in 0.25 M HCl and 400 μL of 0.37% (w/v) thiobarbituric acid (TBA) in 0.25 M HCl at 95 °C, for 15 min. Then, after cooling the absorbance at 535 nm was measured, and the results were expressed as nmol MDA/mL of platelets.

2.7. Dichlorofluorescein fluorescence assay (DCF)

The dichlorofluorescein fluorescence assay was used to measure cellular peroxide production and other reactive species [22]. Aliquots of 50 μL of serum were added to a medium containing Tris-HCl buffer (0.01 mM, pH 7.4) and dichlorofluorescein diacetate (7 μM). After the addition of dichlorofluorescein diacetate, the medium was incubated in the dark for 1 h until the fluorescence measurement (excitation at 488 nm and emission at 525 nm, with both slit widths at 1.5 nm). The oxidized dichlorofluorescein was determined using a standard curve of oxidized dichlorofluorescein and the results were expressed as nM DCF-Oxid/mL [23].

2.8. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities

The SOD activity in platelets was performed according to the method of Misra and Fridovich [24]. In this method, the SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide. A unit of SOD is defined as the quantity of enzymes that inhibit by 50% the speed of oxidation of adrenalin. The SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine–NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM). The SOD activity was expressed in U SOD/mg protein.

The determination of CAT activity in platelets was carried out according to the modified method of Nelson and Kiesow [25]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to CAT dependent decomposition of hydrogen peroxide. An aliquot (20 μ L) of platelets was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was initiated by the addition of 70 μ L in an aqueous solution of hydrogen peroxide 0.3 mol/L. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. The CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient (0.0436 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$), and the results were expressed as nmol/mg of protein.

2.9. Determination of total thiols (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) in platelets

T-SH groups were assayed in platelets by the method of Boyne and Ellman [26] with some modifications. This method consists of the reduction of 5,5'-dithio-(bis-nitrobenzoic) acid (DTNB) in pH 7.0, measured at 412 nm. Results were expressed in μmol T-SH/mL of platelets.

NPSH were assayed in platelets by the method of Ellman [27] with some modifications. Aliquots (100 μ L) of platelets were added to a phosphate buffer 1 mol/L (750 μ L), 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) (50 μ L). Results were expressed as μmol NPSH/mL of platelet.

2.10. Plasma vitamin C content

Plasma VIT C was estimated as described by Galley et al. [28] with some modifications by Jacques-Silva et al. [29]. In this technique, dehydroascorbic acid is mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) such that when treated with sulfuric acid, it forms an orange red compound measured at 520 nm and expressed in μg vit C/mL plasma.

2.11. Serum vitamin E content

Serum VIT E was estimated by a modified method of Hansen and Warwick [30]. In a covered tube, 140 μ L of Milli-Q water

(Millipore, Bedford, MA, USA) was added to 20 μ L of butylated hydroxytoluene 10 mM (BHT), 140 μ L of sample, and 2.1 mL of ethanol solution (66%). The mixture was then vortex-mixed for 10 s and 3.5 mL of *n*-hexane was added and mixed for 1 min followed by centrifugation at $1800 \times g$ for 10 min. Then, 3 mL of the superior phase was transferred to fluorimeter cuvettes and VIT E was measured: excitation: 295 nm; emission: 340 nm. Calibration curves with α -tocopherol were used to determine the concentration, following the same procedure used for the samples. Results were expressed as $\mu\text{mol/L}$ of serum.

2.12. Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method according to Bradford [31] using bovine serum albumin as standard.

2.13. Statistical analysis

For the statistical values, t-student test was used. Results were considered significant at $P \leq 0.05$ and are expressed as mean \pm standard error. Some data were analyzed by Pearson's correlation. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characteristics of subjects

The classification of patients with lung cancer enrolled in this study regarding gender, age, smoking and classification of the disease stage are shown in Table 1. Most of the patients involved in this study were male, over 60 years old; 94% of the men and 80% of the women involved in this study were smokers. The patients were diagnosed with lung cancer in stage IIIb (14% of patients) and IV (86% of patients), according to the Union for International Cancer Control (UICC). The vast majority of patients involved in this study were Caucasian because of the location of the University Hospital of Santa Maria – HUSM. Regarding the control group, the average age was 55 years and most of the individuals involved were Caucasians for the same reason of the patient group. Table 3 describes blood parameters of patients with lung cancer and control individuals. Patients with lung cancer had the erythrocyte count, hemoglobin levels, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular volume lower than the control subjects.

3.2. δ -ALA-D activity

δ -ALA-D activity is shown in Fig. 1. We observed a decrease of 37% in the activity of this enzyme in lung cancer patients when compared with the control group ($P \leq 0.0005$).

Table 1
Characteristics of subjects.

	Patients		Controls	
	Men	Women	Men	Women
Number of patients	18 (64%)	10 (36%)	15 (54%)	13 (46%)
Mean age	65 \pm 10 years	64 \pm 9 years	60 \pm 8 years	59 \pm 10 years
Race				
Caucasians	14 (78%)	10 (100%)	14 (93%)	11 (85%)
African descendants	4 (22%)	0 (0%)	1 (7%)	2 (15%)
Staging				
IIIb	2 patients	2 patients	–	–
IV	16 patients	8 patients	–	–
Smokers	17 patients	8 patients	–	–
Non-smokers	1 patients	2 patients	15 patients	13 patients
Years of smoking	42 years	38 years	–	–

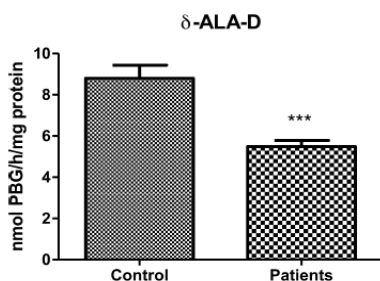


Fig. 1. δ -ALA-D activity in whole blood of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error ($n = 10$). ***Indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P \leq 0.0005$).

3.3. δ -ALA-D activity in the presence of cisplatin and gencitabine

No changes were observed in the enzymatic activity of δ -ALA-D in whole blood in the presence of the antineoplastic drugs, cisplatin and gencitabine, in plasma concentrations achievable during their use when tested in the same biological samples obtained from control individuals (data not show).

3.4. TBARS and RS levels

TBARS in platelets and RS in serum are shown in Fig. 2. TBARS and RS levels were, respectively, 99% and 8% higher in lung cancer patients when compared with the control group ($P \leq 0.05$ and $P \leq 0.005$).

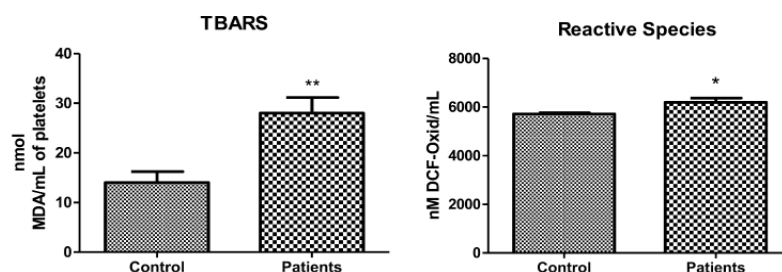


Fig. 2. TBARS and RS levels, in platelets and serum, respectively, of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error ($n = 28$; $n = 13$). ** and * indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P \leq 0.005$ and $P \leq 0.05$).

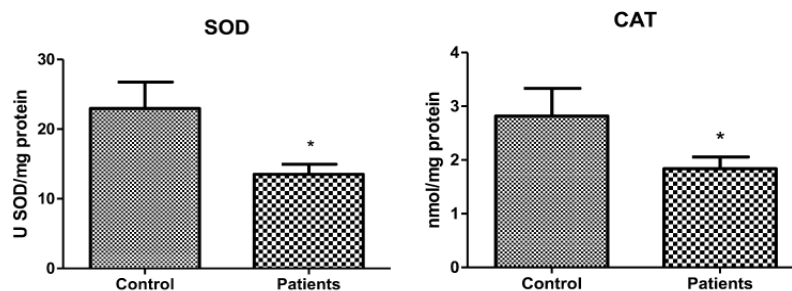


Fig. 3. SOD and CAT activities in platelets of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error ($n = 28$). *Indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P \leq 0.05$).

3.5. SOD and CAT activity

SOD and CAT activities are shown in Fig. 3. We observed a decrease of 41% and 35% in the SOD and CAT activities in platelets, respectively, from lung cancer patients when compared with the control group ($P \leq 0.05$).

3.6. T-SH and NPSH levels

T-SH and NPSH levels in platelets are shown in Fig. 4. T-SH levels were 27% higher in lung cancer patients when compared with the control group ($P \leq 0.05$). No difference was observed in NPSH levels between patients and control groups, respectively (NPSH: $0.65 \pm 0.01/0.67 \pm 0.02$).

3.7. Vitamin C and Vitamin E levels

Vitamin C and E levels are shown in Fig. 5. VIT C levels in plasma were 127% lower in lung cancer patients when compared with the control group ($P \leq 0.0005$). However, VIT E levels in serum were 44% higher in lung cancer patients when compared with the control group ($P \leq 0.05$).

4. Discussion

The high incidence of lung cancer in the world population, which is clearly observed by statistical data, is closely related to tobacco use in communities [32]. Smoking is characterized as one of the main factors that lead to the development of cancer in the last 50 decades [33], and several epidemiological studies have been developed in response to this correlation.

Researchers have suggested that smoking is responsible for almost 90% of cases of lung cancer diagnosed. Moreover, the risk of

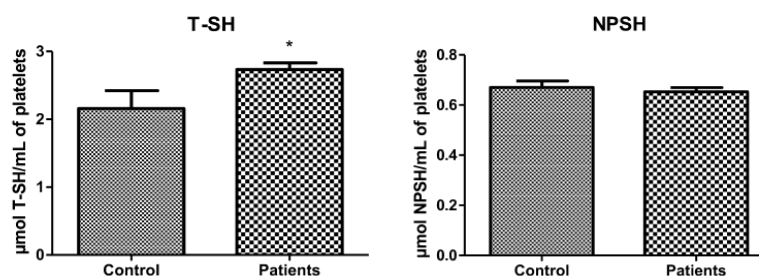


Fig. 4. T-SH and NPSH levels in platelets of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error ($n = 28$). * indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P \leq 0.05$).

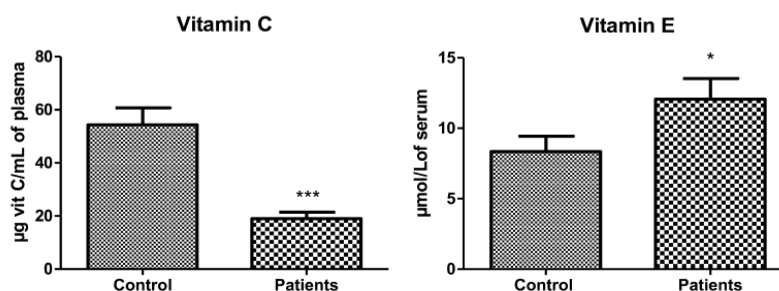


Fig. 5. Vitamin C, in plasma, and Vitamin E, in serum, levels of patients with lung cancer. Results are expressed as mean \pm standard error ($n = 28$). *** and * indicates a significant difference between the control and patients with lung cancer group ($P \leq 0.0005$ and $P \leq 0.05$), respectively.

death from lung cancer is 7–14 times higher among smokers than among non-smokers [34], reason for which Zander et al. [35] state that lung cancer is a disease primarily environmental.

Over 4000 toxic components and, approximately, 60 potentially carcinogenic elements to the user have been identified in tobacco [36]. Only in cigarette smoke it can be identified around 200 amines as well as dozens of different polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrosamines, metals, such as nickel, cadmium, and lead, besides ammonia, ketones, and acetaldehyde [35,37]. Thus, the interaction of metabolic active carcinogens of the cigarette with the DNA of the cells can cause severe phenotypic alterations, which are critical events in the development of tumors [38].

In this context, it is noteworthy that 89% of patients involved in this study had been active smokers, for four decades, on average. Thus, in these sustained environmental stress conditions, the overproduction of RS may cause significant damage to the structure and function of cells, DNA mutations and cancer initiation and progression [39–41].

It is also important to emphasize the activity of δ -ALA-D, which plays an important role when used together with other parameters as a marker of oxidative stress and impairment of metabolic processes. In fact, δ -ALA-D has vicinal thiol groups in the active centre that are easily oxidized, making the enzyme extremely sensitive to pro-oxidants, besides being inhibited by heavy metals. The inhibition of δ -ALA-D may result in the accumulation of its substrate δ -ALA in the blood, which is related to the overproduction of RS. The δ -ALA enzyme may undergo enolization and oxidation in the presence of metals at physiological pH, producing superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical [18,42].

In our study, lung cancer patients had lower δ -ALA-D activity when compared with controls, which may contribute to the development of oxidative stress in these patients, since the δ -ALA

levels may be elevated. It is important to note that δ -ALA-D enzyme may have its activity inhibited by the action of various metals, such as mercury [43,44], lead [45], and cadmium [46]. Since these metals are constituents of cigarette and 89% of patients enrolled in this study smoked for several years, it can be suggested that the inhibition of δ -ALA-D activity is correlated with smoking.

On the other hand, the decrease in the δ -ALA-D activity may be involved in the mechanisms that promote anemia in patients with lung cancer, since this enzyme is involved in the synthesis of heme. In fact, we observed that most of the patients involved in this study had hemoglobin levels around 10.7 mg/dL (Table 2), lower values than those of the control group (13.4 mg/dL). Several studies have shown that anemia is a common complication in cancer patients, with up to 70% of these patients having anemia at some period in their disease or treatment [47]. The incidence and severity of anemia depends on the type of tumor, patient age, stage of disease, as well as type and intensity of treatment [48]. The development of

Table 2
Blood parameters of patients with lung cancer and control individuals.

Parameter	Patients	Control
Erythrocytes (million/mm ³)	3.7 \pm 0.15*	4.5 \pm 0.41
Hemoglobin (g/dL)	10.7 \pm 0.32**	13.4 \pm 0.15
Hematocrit (%)	33.0 \pm 1.14	37.8 \pm 1.68
HCM	29.2 \pm 0.47*	31.7 \pm 0.49
CHCM (g/dL)	32.8 \pm 0.25	32.7 \pm 0.30
VCM (fL)	88.9 \pm 1.14**	96.9 \pm 0.95
RDW (%)	16.2 \pm 0.47*	13.9 \pm 0.46

In the table are the averages of blood parameters observed in patients with lung cancer and control groups. HCM: mean corpuscular hemoglobin; CHCM: Mean corpuscular hemoglobin concentration; VCM: mean corpuscular volume; RDW: Red Cell Distribution Width.

* $P < 0.05$

** $P < 0.005$.

Table 3
Activity of SOD and CAT and its correlation with oxidative stress parameters in patients with lung cancer.

Correlation	Pearson <i>r</i>	<i>P</i> value (two-tailed)	<i>R</i> ²
SOD versus CAT	0.7459	0.0084*	0.5564
SOD versus TBARS	-0.5998	0.0303*	0.3596
CAT versus TBARS	-0.5608	0.0125*	0.3145
SOD versus VIT C	0.6335	0.0201*	0.4014
CAT versus VIT C	0.4517	0.0790	0.2040
SOD versus VIT E	0.5953	0.0412*	0.3543
CAT versus VIT E	0.6038	0.0289*	0.3645

* *P* < 0.05.

anemia in cancer patients is multifactorial. Different mechanisms, such as blood loss, increased destruction of red blood cells or a decrease in its production could coexist in the same patient [47]. Furthermore, the inhibition of ALA-D activity may also contribute to this condition in lung cancer patients.

In an attempt to elucidate the oxidant and antioxidant profile of these patients, other parameters were also determined, such as RS and lipid peroxidation levels, which have been implicated in the pathogenesis of various diseases, including cancer [49]. In line with this, the increase of TBARS levels in platelets of lung cancer patients may be an indication that RS may attack the membrane lipids of these structures, and the continuous oxidative damage may lead to the destruction of the membrane altering platelet function [50].

Previous studies of our research group in patients with lung cancer [51] have shown alterations in the activity of enzymes anchored in the membrane of platelets, such as ectonucleotidases and adenosine deaminase, and the process of lipid peroxidation may be involved in this mechanism [52]. Acting to protect the organism against these harmful pro-oxidants is a complex system of enzymatic antioxidants (SOD and CAT) and non-enzymatic antioxidants (glutathione, VIT C and E) [53]. In our study, we observed a decrease in SOD and CAT activities in patients with lung cancer suggesting that deleterious effects may be occurring due to the accumulation of RS in platelets. A possible mechanism for this condition may be the enzymatic inactivation caused by the excess of free radicals [54,55]. Excessive RS may be interacting with the membrane proteins and lipids causing oxidative damage and irreversible changing in the vital functions of platelets by altering the membrane integrity of these structures [50,52]. Moreover, since δ -ALA-D is involved in the synthesis of tetrapyrrole molecules, which constitute the prosthetic group of CAT [15], its reduced activity may be related with changes in the synthesis of heme. In addition, decreased levels of VIT C observed in patients with lung cancer, in this study, may be an indication of the significant pro-oxidant state, since this vitamin could directly combat RS, nitric oxide as well as hypochlorous acid, which are directly involved in the processes of stress [56].

In contrast with the decrease of VIT C levels in our study, we verified an increase in T-SH and VIT E levels, in platelets and serum, respectively, in lung cancer patients. The actions of these non-enzymatic antioxidants are extremely important because they contribute to the protection of normal cell structures and functions. The -SH groups are involved in maintaining the redox homeostasis, quenching free radicals, and participating in detoxification reactions [57]. Similar to our results, several studies have shown that elevated GSH levels are observed in various types of cancerous cells and solid tumors, and this tends to make these cells and tissues more resistant to chemotherapy, since the toxicity of antitumor drugs depend largely on the decreased levels of GSH. [58–61].

VIT E may be distributed by lipid membranes due to its high lipid solubility thus, constituting the primary means of protection

of cell membranes against oxidative damage [62]. However, despite the elevation in both GSH and VIT C, this strategy antioxidant defense may have not been sufficient to combat excessive attack pro-oxidant present in these individuals, since an increased in lipid peroxidation was observed.

Data in Table 3 show a positive correlation between SOD and CAT activities, between the SOD activity and VIT C and E levels, as well as between the CAT activity and levels of VIT E. Moreover, a negative correlation was observed between the activities of SOD and CAT in relation to the TBARS levels. These results may collaborate with the hypothesis that the lipid peroxidation of enzymatic membranes may interfere in the activities of SOD and CAT in platelets, in the same way that the non-enzymatic antioxidants may be protecting these enzymes against the attack of RS, as demonstrated in other studies [63,64].

5. Conclusion

Interestingly, to the best of our knowledge, for the first time we have observed the δ -ALA-D activity and its association with oxidative stress parameters in patients with lung cancer. Thus, this study is of great importance to understand the conditions in which they are patients with lung cancer, so that additional therapies are proposed in order to improve the health status of these patients.

References

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9–29.
- [2] Klautig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239–67.
- [3] Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 1995;358:1–3.
- [4] Maldonado PA, Negrini LA, Kaizer RR, et al. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. *Clin Chim Acta* 2006;366:174–8.
- [5] Farias IL, Farias JG, Rossato L, et al. Correlation between TBARS levels and glycolytic enzymes: the importance to the initial evaluation of clinical outcome of colorectal cancer patients. *Biomed Pharmacother* 2011;65:395–400.
- [6] Ardies CM. Inflammation as cause for scar cancers of the lung. *Integr Cancer Ther* 2003;2:238–46.
- [7] Cook JA, Gius D, Wink DA, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol* 2004;14:259–66.
- [8] Goto H, Yanagimachi M, Kajiwaru R, Kuroki F, Yokota S. Lack of mitochondrial depolarization by oxidative stress is associated with resistance to buthionine sulfoximine in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Res* 2007;31:1293–301.
- [9] Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003;42:1075–81.
- [10] Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes. *Clin Chim Acta* 2004;339:1–9.
- [11] Bakan N, Taysi S, Yilmaz O, et al. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chim Acta* 2003;338:143–9.
- [12] Mantovani G, Maccio A, Lai P, Massa E, Ghiani M, Santona MC. Cytokine activity in cancer-related anorexia/cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate. *Semin Oncol* 1998;25:45–52.
- [13] Oliveira RB, Alves RJ. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Química Nova* 2002;25:976–84.
- [14] Farina M, Brandao R, Lara FS, Soares FA, Souza DO, Rocha JB. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicol Lett* 2003;139:55–66.
- [15] Jaffe EK, Ali S, Mitchell LW, Taylor KM, Volin M, Markham GD. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of Escherichia coli porphobilinogen synthase. *Biochemistry* 1995;34:244–51.
- [16] Sassa S. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982;28:133–45.
- [17] Sassa S. ALA-D porphyria. *Semin Liver Dis* 1998;18:95–101.
- [18] Rocha ME, Dutra F, Bandy B, et al. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Arch Biochem Biophys* 2003;409:349–56.
- [19] Goncalves TL, Erthal F, Corte CL, et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clin Biochem* 2005;38:1071–5.

- [20] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225–30.
- [21] Olas B, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. D-glucaro 1,4-lactone and resveratrol as antioxidants in blood platelets. *Cell Biol Toxicol* 2008;24:189–99.
- [22] Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1575–82.
- [23] Perez-Severiano F, Rodriguez-Perez M, Pedraza-Chaverri J, et al. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 2004;45:1175–83.
- [24] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170–5.
- [25] 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.
- [26] Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem* 1972;46:639–53.
- [27] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
- [28] Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading. *Free Radic Biol Med* 1996;20:139–43.
- [29] Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001;88:119–25.
- [30] Hansen LG, Warwick WJ. A fluorometric micro method for fat tocopherol. *Clin Biochem* 1970;3:225–9.
- [31] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [32] cancer IAoro. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: tobacco smoke and involuntary smoking; 2004.
- [33] Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 2004;45:3–9.
- [34] Jamnik S. Câncer de Pulmão e Tabagismo: os números; 2012.
- [35] Zander DSea. Molecular pathology of lung disease. New York: Springer; 2008.
- [36] Mackay J, Eriksen M. The tobacco atlas. Hong Kong: Healtyh Organization; 2002.
- [37] Boing AF, Peres MA, Antunes JL. Mortality from oral and pharyngeal cancer in Brazil: trends and regional patterns, 1979–2002. *Rev Panam Salud Publica* 2006;20:1–8.
- [38] Cavenari RA, Rogatto SR. Câncer de cabeça e pescoço. Atheneu: São Paulo; 2004.
- [39] Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:290–302.
- [40] Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett* 2009;282:125–36.
- [41] Visconti R, Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009;12:240–5.
- [42] Bechara EJ. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:841–51.
- [43] Rocha JB, Pereira ME, Emanuelli T, Christofari RS, Souza DO. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 1995;100:27–37.
- [44] Emanuelli T, Rocha JB, Pereira ME, et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol Toxicol* 1996;79:136–43.
- [45] Goering PL. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology* 1993;14:45–60.
- [46] Luchese C, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW, Santos FW. Cadmium inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase from rat lung in vitro: interaction with chelation and antioxidant agents. *Chem Biol Interact* 2007;165:127–37.
- [47] Calabrich AFC, Katz A. Iron deficiency in cancer patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010;32.
- [48] Bokemeyer C, Foubert J. Anemia impact and management: focus on patient needs and the use of erythropoietic agents. *Semin Oncol* 2004;31:4–11.
- [49] Goncalves TL, Benvenuto DM, Bonfanti G, Frediani AV, Pereira DV, Rocha JB. Oxidative stress and delta-ALA-D activity in different conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. *Clin Biochem* 2009;42:602–10.
- [50] Vinas G, Puig T, Porta R. [Oxidative stress in patients with cancer: two sides of the same coin]. *Med Clin (Barc)* 2012;139:171–5.
- [51] Zanini D, Schmatz R, Pimentel VC, et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomed Pharmacother* 2012;66:40–5.
- [52] Padmavathi P, Reddy VD, Kavitha G, Paramahansa M, Varadacharyulu N. Chronic cigarette smoking alters erythrocyte membrane lipid composition and properties in male human volunteers. *Nitric Oxide* 2010;23:181–6.
- [53] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010;16(49):3–1616.
- [54] Stevens MJ. Redox-based mechanisms in diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1483–5.
- [55] Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim* 2012;94:374–83.
- [56] Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71:725–31.
- [57] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84.
- [58] Calvert P, Yao KS, Hamilton TC, O'Dwyer PJ. Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione. *Chem Biol Interact* 1998;111–112:213–24.
- [59] Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct* 2004;22:343–52.
- [60] Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43:143–81.
- [61] Zhao Y, Seefeldt T, Chen W, et al. Increase in thiol oxidative stress via glutathione reductase inhibition as a novel approach to enhance cancer sensitivity to X-ray irradiation. *Free Radic Biol Med* 2009;47:176–83.
- [62] Rodríguez GP. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1997;11:46–57.
- [63] Kadkhodae M, Khastar H, Arab HA, Ghaznavi R, Zahmatkesh M, Mahdavi-Mazdeh M. Antioxidant vitamins preserve superoxide dismutase activities in gentamicin-induced nephrotoxicity. *Transpl Proc* 2007;39:864–5.
- [64] Shittu M, Ayo JO, Ambali SF, Fatihu MY, Onyeanus BI, Kawu MU. Chronic chlorpyrifos-induced oxidative changer in the testes and pituitary gland of Wistar rats: ameliorative effects of vitamin C. *Pest Biochem Physiol* 2012;102:79–85.

4 DISCUSSÃO

No contexto da saúde pública mundial, o câncer de pulmão mantém-se no topo do *ranking* das patologias com maiores índices de incidência e mortalidade. No Brasil, a incidência do câncer de pulmão tem aumentado nas últimas décadas, sendo que essa patologia é a principal causa de morte por câncer entre homens e a segunda principal causa de morte por câncer entre as mulheres (JEMAL et al., 2011; YU et al., 2014).

Há duas classificações histológicas para o câncer de pulmão, os carcinomas pulmonares de pequenas células (CPPC) e os carcinomas pulmonares de não pequenas células (CPNPC). A literatura destaca que cerca de 80% dos casos de câncer de pulmão diagnosticados apresentam classificação histológica de CPNPC, os quais incluem os carcinomas de células escamosas, os adenocarcinomas e os carcinomas de grandes células (LI et al., 2012).

Corroborando com esses dados, em nossos estudos (ZANINI et al., 2012; ZANINI et al., 2013; ZANINI et al., 2014), foi possível perceber que a frequência de diagnósticos de CPNPC nos indivíduos atendidos e assistidos pelo Hospital Universitário de Santa Maria é muito superior do que os casos de CPPC, razão pela qual a população escolhida para o desenvolvimento dos estudos aqui apresentados foi a de pacientes com diagnóstico de CPNPC.

Em relação à perspectiva de cura e de sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão, as estatísticas mostram que essa patologia ainda apresenta uma letalidade extremamente elevada. Menos de 15% dos pacientes que têm diagnóstico de câncer de pulmão sobrevivem 5 anos após a descoberta da doença e isso se deve especialmente ao fato de que o diagnóstico ocorre principalmente nos estádios mais avançados do processo neoplásico (DUARTE; PASCHOAL, 2005; LI et al., 2012).

Dessa forma, torna-se fundamental destacar que, intimamente relacionada ao processo de desenvolvimento do câncer de pulmão nas populações, está a disseminação do hábito de fumar cigarros entre os indivíduos. Os dados epidemiológicos a respeito do tabagismo apontam que ele se apresenta, nas últimas 5 décadas, como sendo o principal fator que leva ao desenvolvimento de câncer de pulmão, sendo que a esse péssimo hábito também se correlacionam a frequência e

a quantidade de cigarros consumidos (COTE et al., 2009; ROCA; ROCA; MIHAESCU, 2012).

Não destoando desses dados, os estudos aqui apresentados também revelaram uma forte relação entre o desenvolvimento de câncer de pulmão e o tabagismo, já que a vasta maioria dos pacientes envolvidos em nossas pesquisas foi fumante por pelo menos 40 anos e consumia uma expressiva quantidade de cigarros diariamente.

Esse binômio *tabagismo-câncer de pulmão* também é comumente relatado na literatura. Dados reportam que aproximadamente 87% dos casos de câncer de pulmão devem-se à exposição ativa ou passiva ao tabaco. Além disso, o risco relativo de desenvolver câncer de pulmão é 24 vezes maior entre os fumantes do que entre os indivíduos não fumantes (DUARTE; PASCHOAL, 2005).

Convém salientar, ainda, que já foram identificados no cigarro cerca de 60 compostos com atividade carcinogênica ao organismo humano. As principais classes de compostos carcinogênicos identificados nos cigarros incluem os hidrocarbonetos policíclicos, as nitrosaminas e as aminas aromáticas, além de metais como o cádmio e o níquel (ZANDER et al., 2008; YU et al., 2014).

A interação dos carcinógenos ativos do cigarro com o DNA celular causa severas alterações fenotípicas, como, por exemplo, a inativação de genes supressores de tumores e a ativação de pró-oncogenes, eventos que são cruciais para o desenvolvimento de doenças neoplásicas (ZANDER et al., 2008). Além disso, os compostos do cigarro facilitam outros acontecimentos que são determinantes tanto para o desenvolvimento quanto para a progressão tumoral que são os processos de angiogênese e os processos inflamatórios crônicos.

A ocorrência da inflamação crônica devido ao tabagismo é mediada por uma série de fatores, como a estimulação da expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) e a consequente síntese de prostaglandinas em uma grande variedade de células, o aumento no número de células polimorfonucleares circulantes, o aumento dos níveis de proteínas de fase aguda circulantes, o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 entre outros (HUANG et al., 2011). Nesse cenário, torna-se possível e plausível a associação de três elementos: *tabagismo – inflamação – câncer*.

Em 1863, Rudolf Virchow observou que tecidos provenientes de sítios tumorais apresentavam infiltração de células imunes e, desse modo, pela primeira

vez havia sido hipotetizada a relação entre processos inflamatórios crônicos e a tumorigênese. Atualmente, essa hipótese é amplamente aceita e acredita-se que aproximadamente 15% dos tumores se desenvolvam em locais de inflamação crônica (AL-ZHOUGHBI et al., 2014).

Ademais, a literatura aponta que o estado de inflamação crônica contribui para o processo de carcinogênese em todos os seus estágios, facilitando a iniciação tumoral pela geração de compostos genotóxicos, propiciando a proliferação celular e estimulando a progressão tumoral através da liberação de fatores angiogênicos (AL-ZHOUGHBI et al., 2014). Destaque-se, ainda, que esse ambiente rico em células imunes também é constituído de outros componentes dos processos inflamatórios, tais como as citocinas.

Chen e colaboradores, em 2008, propuseram uma teoria que sugere que as células tumorais, através da secreção de citocinas no microambiente tumoral, modulam a resposta imune local em seu favor. Nesse contexto, a IL-6 seria a citocina pró-tumoral melhor caracterizada até o momento.

Nossos estudos demonstraram que pacientes com CPNPC, em estágio avançado da patologia, apresentam níveis séricos de IL-6 significativamente maiores que os encontrados no grupo de indivíduos saudáveis. Outros estudos também vão ao encontro dos nossos resultados, apontando níveis elevados de IL-6 em pacientes com tumores de mama (SOTIRIOU et al., 2001), fígado, pâncreas entre outros (TANIGUCHI; KARIN, 2014).

A IL-6 apresenta importante papel no desenvolvimento e na progressão de tumores, pois participa dos processos de angiogênese, facilita a invasividade das células tumorais em outros sítios e tem habilidade de ativar sinais oncogênicos, como o STAT3, que tem ação anti-apoptótica, angiogênica, metastásica entre outras (TANIGUCHI; KARIN, 2014).

Outra citocina que também apresenta destaque na literatura pelo envolvimento na patogênese de doenças inflamatórias como o câncer é a IL-17. Em nossos estudos, observamos uma diminuição nos níveis séricos de IL-17 nos pacientes com câncer de pulmão em relação ao grupo controle. As ações da IL-17 no processo de desenvolvimento tumoral ainda são bastante controversas na literatura.

Estudos mostram que a IL-17 estimula a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, a IL-1 β e as quimiocinas, tanto pelas células endoteliais,

quanto pelas próprias células tumorais, além de estimular a formação de novos vasos, fatos que promoveriam crescimento tumoral. Contudo, outros trabalhos demonstram que a IL-17 estimularia a maturação de células dendríticas e a síntese de IL-12 - a qual ativaria linfócitos T citotóxicos - desenvolvendo, dessa forma, uma ação anti-tumoral (KARCZMARCZYK; KAPP; GIANNOPOULOS, 2014).

Um dado bastante importante destacado na literatura e que apresenta forte relação com os nossos achados, em relação aos níveis de IL-17 em pacientes com neoplasias, é que essa citocina estaria diminuída em estágios avançados do desenvolvimento de tumores, como o tumor coloretal (WANG et al., 2013). Considerando que os pacientes incluídos em nossos estudos apresentavam CPNPC com classificação de estadiamento IV da patologia, que é a forma mais avançada da doença, poderíamos sugerir que os níveis séricos de IL-17 diminuídos, em nosso grupo de pacientes, podem estar relacionados com o estadiamento da doença.

Além da relação entre processo inflamatório e desenvolvimento tumoral, a ocorrência de processos trombóticos em pacientes com câncer também é frequentemente relatada na literatura médica (KARIMI; COHAN, 2010). A primeira associação entre trombose e câncer foi descrita em 1865 por Armand Trousseau e, atualmente, o tromboembolismo venoso é caracterizado como uma das principais complicações observadas em pacientes com tumores.

A fisiopatologia da formação de trombos em pacientes oncológicos é bastante complexa e está associada a diferentes mecanismos, que incluem os processos inflamatórios, a liberação de citocinas, a ativação do sistema fibrinolítico, a liberação de proteínas de fase aguda - incluindo o fibrinogênio, o fator VIII de coagulação e o fator de von Willebrand - (STEGNER; DÜTTING; NIESWANDT, 2014), assim como alterações na atividade de enzimas do sistema purinérgico que hidrolisam moléculas importantes para os processos de coagulação, como o ADP.

No que diz respeito à atividade das enzimas do sistema purinérgico como a E-NTPDase, a ecto-5'-nucleotidase e a E-ADA, nossos estudos mostraram alterações na atividade dessas enzimas em plaquetas de pacientes com câncer de pulmão. Similarmente, outros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisas verificaram que a hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina também está alterada em uma série de neoplasias como no câncer de mama, câncer de próstata e câncer de colo uterino (ARAÚJO et al., 2005; MALDONADO et al., 2010, BATTISTI et al., 2013).

Verificamos, em nossa pesquisa, que a atividade da E-NTPDase em plaquetas para a hidrólise do ATP não apresentou alteração em relação à atividade do grupo controle, enquanto que a atividade da E-NTPDase em plaquetas para a hidrólise do ADP apresentou-se aumentada no grupo de pacientes com câncer de pulmão. Resultados semelhantes, quanto à hidrólise do ADP, foram observados em estudos realizados em pacientes com câncer de mama e em pacientes com neoplasia de colo uterino (ARAÚJO et al., 2005; MALDONADO et al., 2010). Esses resultados, portanto, reforçam a relação entre o desenvolvimento de doenças neoplásicas e as alterações nas atividades das enzimas do sistema purinérgico.

A diminuição da hidrólise do ADP evidenciada em nosso trabalho favorece o acúmulo desse nucleotídeo no meio extracelular, o que pode facilitar o processo de agregação de plaquetas em pacientes com câncer de pulmão. Estudos têm mostrado que é necessário haver uma co-estimulação dos receptores P2Y1 e P2Y12 para que a indução da agregação plaquetária pelo ADP seja efetivada (KAHNER et al., 2006), embora alguns trabalhos enfatizem que o receptor P2Y12 parece ter maior influência quanto à ativação plaquetária (MOHEIMANI; JACKSON, 2012). O estímulo das plaquetas pelo ADP através desses receptores ocasiona mudanças no formato, na agregação e na geração de TxA₂, fato que caracteriza o ADP como sendo um potente agonista da agregação plaquetária (ENJYOJI et al. 1986; MARCUS et al. 2001; BIRK et al. 2002).

Por outro lado, um mecanismo compensatório à agregação exacerbada das plaquetas poderia estar ocorrendo em virtude da hidrólise do ATP não ter sofrido alterações entre o grupo de pacientes e o grupo controle. Para elucidar melhor esses acontecimentos, realizamos também o teste direto de agregação plaquetária. Por meio dele, verificamos que houve um aumento significativo na agregação plaquetária de pacientes com câncer de pulmão quando 5,0 µM de ADP foram usados como agonista. Em consonância com esse achado, outros estudos, como o desenvolvido por De Cicco (2004) mostraram que anormalidades na coagulação sanguínea ocorrem em mais de 50% dos pacientes com doenças malignas, sendo que esses índices aumentam para 90% na presença de metástases.

Além do envolvimento do ADP nos processos anômalos de coagulação sanguínea em pacientes com câncer, a literatura destaca que os nucleotídeos de adenina também são importantes na rota do crescimento tumoral. Munson e colaboradores (1995) sugerem que plaquetas podem secretar fatores de

crescimento que estimulam a proliferação das células tumorais, além de protegerem as células malignas do contra-ataque das células do sistema imune favorecendo, dessa maneira, o extravasamento de células tumorais para outros tecidos e conseqüentemente a formação de metástases (STEGNER; DÜTTING; NIESWANDT, 2014). Assim, os níveis elevados de ADP também poderiam favorecer progressão tumoral.

Em adição, nosso estudo demonstrou que a atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase em plaquetas apresentou-se aumentada no grupo de pacientes com câncer de pulmão em relação ao grupo controle. O aumento na atividade dessa enzima promove um incremento nos níveis de adenosina extracelulares e, levando-se em conta as propriedades pró-carcinogênicas exercidas pela adenosina (entre as quais destacam-se as funções promotoras de crescimento tumoral, de estímulo à angiogênese e de redução da hipóxia tecidual, através de sua atividade vasodilatadora) (RATHBONE, 1992; SPYCHALA, 2000; GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007), essa alteração na atividade da ecto-5'-nucleotidase poderia estar colaborando ainda mais para a progressão tumoral nos pacientes com câncer de pulmão.

Aliado a isso, a diminuição na atividade da enzima E-ADA observada no presente trabalho também colabora para o incremento dos níveis séricos de adenosina que, de acordo com o proposto por Spychala e Kitajewski (2004), poderia promover inclusive a resistência do tumor ao tratamento com drogas antineoplásicas. Complementarmente ao envolvimento dos processos inflamatórios e trombóticos na patogênese das neoplasias, especialmente no câncer de pulmão que é o destaque da nossa pesquisa, a ocorrência de estresse oxidativo em pacientes com câncer também é frequentemente relatada.

Como foi mencionado inicialmente, o tabagismo, além de ser fator determinante para o desenvolvimento dos processos inflamatórios, participa também do desenvolvimento de estresse oxidativo, sendo que a associação entre câncer, tabagismo e a presença de processos oxidativos tem sido repetidamente comentada na literatura (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; TOYOKUWI, 1995; MALDONADO et al., 2006; FARIAS et al., 2011).

As células tumorais são reconhecidamente as maiores responsáveis pela produção e liberação de agentes oxidantes na circulação (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004). Nesse sentido, a atividade da enzima δ -aminolevulínico desidratase (δ -ALA-

D) tem sido utilizada como biomarcador do estresse oxidativo em diferentes patologias, já que, devido a sua natureza sulfidrílica, a enzima δ -ALA-D pode ser inibida por uma variedade de metais pesados e outros agentes pró-oxidantes que possuam a propriedade química de oxidar grupamentos -SH. A inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ALA-D no sangue, o qual está relacionado com a superprodução de EROs (FARINA et al., 2003).

Em nosso estudo, os pacientes com câncer de pulmão apresentaram uma diminuição na atividade da δ -ALA-D eritrocitária quando comparados com o grupo controle. Tendo em vista esse achado, podemos sugerir que o acúmulo de ALA-D no sangue de pacientes com câncer de pulmão pode estar contribuindo para o incremento do quadro de estresse oxidativo nesses pacientes, uma vez que o excesso de ALA-D induz a liberação do íon ferro da ferritina que pode iniciar um processo de peroxidação lipídica além de predizer uma produção exagerada de espécies reativas (SOUZA, 2004).

Vale salientar, outrossim, que a enzima δ -ALA-D pode ter sua atividade inibida através da ação de vários metais como o mercúrio, o chumbo e o cádmio (EMANUELLI et al., 1996; LUCHESE et al., 2007). Considerando que esses metais são constituintes do cigarro e, como citado no início desse trabalho, aproximadamente 90% dos pacientes envolvidos nesse estudo haviam sido fumantes por vários anos, podemos sugerir que a inibição da δ -ALA-D também pode estar associada com o tabagismo.

Por meio da nossa investigação, verificamos que os pacientes com câncer de pulmão apresentaram níveis de hemoglobina em torno de 10,7 mg/dL, índice bem menor que o observado no grupo de indivíduos saudáveis, que foi de 13,4 mg/dL. Destaque-se que a enzima δ -ALA-D está envolvida em etapas da síntese dos grupamentos heme da hemoglobina, pelo que a diminuição na sua atividade pode estar influenciando a ocorrência de quadros anêmicos nos pacientes com câncer de pulmão.

Vários estudos mostram que os processos anêmicos são complicações comumente visualizadas em pacientes portadores de doenças neoplásicas, sendo que cerca de 70% desses pacientes apresentam anemia em algum período de sua doença e ou tratamento (CALABRICH; KATZ, 2010). Vale lembrar que esses índices de incidência de anemia relacionam-se também com o tipo de tumor, com o estágio

da doença, com a idade dos pacientes e com a intensidade do tratamento (BOKEMEYER; FOUBERT, 2004).

Na tentativa de elucidar melhor o perfil oxidante e antioxidante dos pacientes com câncer de pulmão que fizeram parte do nosso grupo de estudos, outros parâmetros, como os níveis de espécies reativas e o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), também foram investigados. Verificamos um aumento significativo nos níveis de TBARS em plaquetas, assim como um aumento nos níveis séricos de espécies reativas em pacientes com câncer de pulmão quando comparados com o grupo controle.

Os níveis de TBARS elevados em plaquetas podem ser um indício de que as espécies reativas estariam agindo sobre a membrana lipídica dessas estruturas, alterando a função plaquetária (VINAS; PUIG; PORTA, 2012; PADMAVATHI, 2010). Esses resultados sugerem que o processo de peroxidação lipídica poderia estar contribuindo para as alterações verificadas nas atividades das enzimas ancoradas na membrana das plaquetas como as ectonucleotidases e a E-ADA (ZANINI et al., 2012).

Na tentativa de neutralizar a ação desses agentes pró-oxidantes, a ação de complexos antioxidantes enzimáticos (como a SOD e a CAT) e não enzimáticos (como os T-SH, os NPSH, a VIT C e a VIT E) apresentam papel de destaque.

Nosso estudo mostrou uma significativa diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT em plaquetas de pacientes com câncer de pulmão, sugerindo, assim, que o acúmulo de espécies reativas antes referido poderia estar exercendo efeitos deletérios sobre as plaquetas através da inativação enzimática. O excesso de espécies reativas pode estar interagindo com as proteínas e lipídios de membrana das plaquetas, causando um dano oxidativo irreversível, alterando tanto a função, quanto a integridade dessas estruturas.

Além disso, os níveis de VIT C diminuídos nos pacientes com câncer de pulmão pode ser outro indício do significativo estado pró-oxidante em que esses pacientes se encontram, uma vez que essa vitamina tem a capacidade de agir diretamente sobre as espécies reativas, sobre o óxido nítrico e sobre o ácido hipocloroso, que são elementos diretamente envolvidos nos processos de estresse oxidativo (CHAN, 1993).

Em contraste com o observado nos níveis de VIT C, verificamos em nosso trabalho um aumento tanto nos níveis de tióis totais em plaquetas, quanto nos níveis

séricos de VIT E em pacientes com câncer de pulmão. A ação desses antioxidantes não enzimáticos é extremamente relevante nos processos de estresse oxidativo, já que contribuem intensamente para a proteção das estruturas celulares normais e suas funções (VALKO et al., 2007).

Todavia, em relação ao câncer, alguns estudos têm demonstrado que níveis elevados de glutathione são observados em diversos tipos tumorais, podendo essa característica estar associada a uma maior resistência por parte das células malignas ao tratamento quimioterápico, já que a toxicidade antitumoral das drogas antineoplásicas depende largamente da diminuição dos níveis de glutathione (BALENDIRAN; DABUR; FRASER, 2004; ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006; ZHAO et al., 2009).

Diante do exposto, nota-se a estreita relação entre o tabagismo, o desenvolvimento de processos inflamatórios e trombóticos e a ocorrência de estresse oxidativo na patogênese das neoplasias, especialmente no câncer de pulmão. A análise desses resultados, em conjunto, apresenta grande relevância para o contexto médico e de saúde pública, visto que medidas preventivas e paliativas podem ser adotadas de maneiras mais eficientes, a fim de que os pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão possam apresentar uma melhor qualidade de vida e um prolongamento da sobrevivência.

5 CONCLUSÃO

- ✓ Os pacientes com câncer de pulmão apresentaram um aumento nos níveis séricos de IL-6, os quais estão intimamente relacionados com o desenvolvimento e a progressão tumoral, uma vez que essa citocina apresenta atividade pró-inflamatória e promotora tumoral. Além disso, os níveis de IL-17 estão diminuídos em pacientes com câncer de pulmão, o que pode estar relacionado com o estágio avançado de desenvolvimento do câncer de pulmão nos pacientes estudados.
- ✓ Os pacientes com câncer de pulmão apresentaram uma diminuição na atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ADP, o que provavelmente está contribuindo para o incremento dos efeitos pró-coagulantes comumente observados em pacientes com doenças neoplásicas. Essa hipótese é reforçada pelo aumento da agregação plaquetária nesses pacientes quando se utilizou ADP como agonista do processo de agregação das plaquetas. Além do mais, os pacientes envolvidos no estudo apresentaram uma diminuição na expressão do CD39 em plaquetas, o que está de acordo com o observado para a atividade da E-NTPDase.
- ✓ Em plaquetas, o câncer de pulmão promoveu um aumento na atividade da ecto-5'-nucleotidase e uma diminuição na atividade da E-ADA, sugerindo que os níveis extracelulares de adenosina estão elevados nesses pacientes. O aumento dos níveis desse nucleosídeo sugere a ocorrência do avanço no desenvolvimento tumoral, tendo em vista as ações promotoras de crescimento tumoral e de estímulo à angiogênese características da adenosina.
- ✓ A atividade da enzima δ -ALA-D apresentou-se diminuída em pacientes com câncer de pulmão, o que pode predizer a ocorrência de um quadro de estresse oxidativo nesses pacientes. Essa situação pode ser sugerida porque a δ -ALA-D é altamente sensível a agentes pró-oxidantes e o acúmulo do seu substrato δ -ALA também promove um incremento dos níveis de espécies reativas liberadas na circulação. Essa inibição enzimática pode ter sido influenciada pelo longo período de tabagismo dos pacientes estudados, já que o cigarro apresenta na sua

constituição metais pesados que podem inativar a enzima, além da superprodução de espécies reativas característica do microambiente tumoral.

- ✓ Os pacientes com câncer de pulmão apresentaram elevados níveis de TBARS e de espécies reativas, resultados que reafirmam a hipótese de que há um processo exacerbado de geração de agentes oxidantes que estão sendo liberados na circulação.

- ✓ As enzimas antioxidantes SOD e CAT apresentaram suas atividades diminuídas em plaquetas de pacientes com câncer de pulmão, sendo que essa inibição enzimática pode ser efeito da superprodução de espécies reativas verificada nesses pacientes. Ademais, os níveis de importantes antioxidantes não enzimáticos estão diminuídos nos pacientes com câncer de pulmão, mostrando que funções benéficas podem estar sendo exercidas de modo ineficiente. Por outro lado, os níveis elevados de T-SH e, por conseguinte, de GSH estão relacionados ao desenvolvimento de resistência tumoral à quimioterapia.

Em conjunto, esses resultados são muito importantes do ponto de vista clínico, pois demonstram que o câncer de pulmão exerce importantes alterações na atividade das enzimas dos sistemas purinérgicos, nos níveis séricos de citocinas inflamatórias e no perfil oxidativo dos pacientes acometidos por essa doença, podendo os parâmetros mencionados neste estudo ser úteis para o monitoramento da patologia e suas complicações.

6 PERSPECTIVAS

Através dos estudos realizados com pacientes com câncer de pulmão até o momento, verificamos que os processos inflamatórios e os eventos de agregação plaquetária exacerbados estão intimamente relacionados com o desenvolvimento e a progressão dessa patologia. Além disso, verificamos que os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina influenciam os processos mencionados acima de maneira extremamente relevante. Sendo assim, adicional a verificação da atividade das enzimas envolvidas na hidrólise dessas moléculas e, conseqüentemente, no controle dos seus níveis no meio extracelular, almejamos dar continuidade aos nossos estudos através da análise da expressão dos receptores do sistema purinérgico em plaquetas e linfócitos.

Diante disso, nossas perspectivas futuras são:

- Dosar os níveis séricos de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina;
- Determinar a expressão de receptores P2X1 e P2X7 em linfócitos de pacientes com câncer de pulmão;
- Avaliar a expressão dos receptores P2Y1 e P2Y12 em plaquetas de pacientes com neoplasia de pulmão;
- Verificar a expressão dos receptores de adenosina A1 e A₂A em plaquetas e linfócitos dos pacientes referidos anteriormente, a fim de que possamos caracterizar melhor as vias envolvidas na patogênese do câncer de pulmão.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. Elsevier, 3. Ed., 2009.

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

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

AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 127, p. 701-721, 2011.

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

ALMEIDA, M. M. **Determinação e quantificação das Vitaminas C e E associadas em produtos cosméticos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

AL-ZHOUGHBI, W. et al. Tumor macroenvironment and metabolism. *Seminars in Oncology*, v. 41, p. 281-295, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. ACS – **The history of cancer**. Disponível em: <www.cancer.org/cancer/cancerBasiscs/TheHisoryofcancer/index>. Acesso em 27 ago. 2014.

ANFOSSI, G. et al. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. *Thrombosis Research*, v. 105, p. 71-8, 2002.

ARAÚJO, M. C. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta*, v. 3, p. 421-426, 2005.

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

ARDIES, C. M. Inflammation as cause for scar cancers of the lung. *Integrative Cancer Therapies*, v. 2, p. 238-246, 2003.

ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 153-158, 2001.

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

BAGATINI, M. D. et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1181-1185, 2008.

BAGATINI, M. D. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 159-164, 2011.

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

BALENDIRAN, G. K.; DABUR, R.; FRASER, D. The role of glutathione in cancer. **Cell Biochemistry & Function**, v. 22, p. 343-352, 2004.

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

BATTISTI, V. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, p. 203-208, 2013.

BECHARA, E. J. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p. 841-851, 1996.

BECKER, L. V. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 1096-1100, 2010.

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

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

BENCHETRIT, F. et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. **Blood**, v. 99, p. 2114-2212, 2002.

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

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

BIRK, A. V. et al. Role of a novel soluble nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactive: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139 p. 116-124, 2002.

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

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

BOER, R. J; PERELSON, A. S. Quantifying T lymphocyte turnover. **Journal of Theoretical Biology**, v. 327, p. 5-87, 2013.

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

BOKEMEYER, C.; FOUBERT, J. Anemia impact and management: focus on patient needs and the use of erythropoietic agents. **Seminars in Oncology**, v. 31, p.4-11, 2004.

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

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

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

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

BRASIL. MS – Ministério da Saúde. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, 2010. **Atlas de Mortalidade por Câncer**. Disponível em: <www.datasus.gov.br>. Acesso em: 02 set. 2014.

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

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

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

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

BURNSTOCK, G. **Purinergic Neurotransmission and Nucleotide Receptors Primer on the Autonomic Nervous System**. 3. Ed., p. 87-93, 2012.

BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signaling and cancer. **Purinergic Signalling**, 2013.

CALABRICH, A. F. C.; KATZ, A. Iron deficiency in cancer patients. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, 2010.

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

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, p. 725-731, 1993.

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

CHEN, X. et al. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. **Lung Cancer**, v. 69, p. 348-354, 2010.

CHOW, M. T.; MÖLLER, A.; SMYTH, M. J. Inflammation and immune surveillance in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 23-32, 2012.

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

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

DE CICCIO M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 50, p. 187-96, 2004.

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

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

DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. **Cancer Research**, v. 72, p. 5441-5445, 2012.

DOMBROWSKI, K. E. et al. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. **Immunology Reviews**, v. 161, p. 111-118, 1998.

DUARTE, R. L. D. M.; PASCHOAL, M. E. M. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. 32:56-65, 2005.

DUARTE, M. M. F. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS Journal**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.

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

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

EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 79, p. 136-143, 1996.

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

ESTRELA, J. M, ORTEGA, A. OBRADOR, E. Glutathione in cancer biology and therapy. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 43, p. 143-181, 2006.

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

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

FARINA, M. et al. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinatase dehydratase from mouse liver, kidney and brain. **Toxicology Letters**, v. 139, p. 55-66, 2003.

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

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

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

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

GANTI, A. K.; LOBERIZA Jr, F. R.; KESSINGER, A. Association of positive family history with survival of patients with lung cancer. **Lung Cancer**, v. 63, p. 136-139, 2009.

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

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

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

GONÇALVES, T. L. et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 1071-1075, 2005.

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

GOUBRAN, H. A. et al. The platelet-cancer loop. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, p. 393-400, 2013.

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

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

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

GUPTA, A. et al. Oxidative stress in non-small cell lung cancer patients after chemotherapy: Association with treatment response. **Respirology**, v. 15, p. 349-356, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

HIRAHARA, N. et al. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. **Oncology**, v. 61, p. 79-89, 2001.

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

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA – Ministério da Saúde. **Como é o processo de carcinogênese**. Disponível em: <www.inca.gov.br/conteudo_view>. Acesso em 28 ago. 2014a.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA – Ministério da Saúde. **Estadiamento**. Disponível em: <<www.inca.gov.br/conteudo_view>>. Acesso em 25 ago. 2014b.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA – Ministério da Saúde. **Estatísticas do câncer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em 26 ago. 2014c.

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

JAMNIK, S. **Câncer de Pulmão e Tabagismo: os números (2012)**. Disponível em: <www.sociedadeclementeferreira.org.br/imagens/tabagismo_e_cancer>. Acesso em 01 set. 2014.

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

KAHNER, B. N. et al. Nucleotide receptor signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, p. 2317-2326, 2006.

KANTHI, Y.M.; SUTTON, N.R.; PINSKY, D.J. CD39: interface between vascular thrombosis and inflammation. **Current Atherosclerosis Report**, v. 16, p. 425, 2014.

KAYNAR, H. et al. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric

oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. **Cancer Letters**, v. 227, p. 133-139, 2005.

KARCZMARCZYK, A; KARP, M; GIANNOPOULOS, K. The role of Th17 cells in tumor immunity. **Acta Haematologica Polonica**, v. 45, p. 155-160, 2014.

KARIMI, M.; COHAN, N. Cancer-Associated Thrombosis. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, p. 78-82, 2010.

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

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

KEITH, T. et al. Increased Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in Barrett's Esophagus and Associated Adenocarcinomas. **Cancer Research**, v. 58, p. 2929-2934, 1998.

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

KRYCZEK, I. et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. **Blood**, v. 114, p. 1141-1149, 2009.

KUKULSKI F., LÉVESQUE S.A., SÉVIGNY J. Impact of ectoenzymes on P2 and P1 receptor signaling. *Pharmacology of Purine and Pyrimidine receptors*, Burlington. **Academic Press**, v. 61, p. 263-299, 2011.

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

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

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

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

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

LI, Q. et al. IL-17 promoted metastasis of non-small-cell lung cancer cells. **Immunology Letters**, v.148, p.144-150, 2012

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

LUCHESE, C. et al. Cadmium inhibits delta-aminolevulinate dehydratase from rat lung in vitro: interaction with chelating and antioxidant agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 165, p. 127-137, 2007.

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

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

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

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

MALDONADO, P.A. et al. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 174-178, 2006.

MALDONADO, P.A. et al. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 499-504, 2010.

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

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

MARCUS, A. J. et al. Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 178-182, 2001.

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

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

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

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.

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

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

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

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

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

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

MOHEIMANI, F.; JACKSON, D.E. P2Y12 receptor: platelet thrombus formation and medical interventions. **International Journal of Hematology**, v. 96, p. 572-587, 2012.

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

MUNSON, L.; UPADHYAYA, N. B.; METER, S. V. Platelet-derived growth factor promotes endometrial epithelial cell proliferation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 173, p. 1820-1825, 1995.

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

PADMAVATHI, P. et al. Chronic cigarette smoking alters erythrocyte membrane lipid composition and properties in male human volunteers. **Nitric Oxide**, v. 23, p. 181-186, 2010.

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

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

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

PINTO, S. et al. Increased thromboxane A2 production at primary tumor site in metastasizing squamous cell carcinoma of the larynx. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 49, p. 527-530, 1993.

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

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

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

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

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Genética – Mutagênese Ambiental. Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Reimpressão 2006. 356 p.

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

ROCA, M.; ROCA, I. C.; MIHAESCU, T. Lung cancer - a comorbidity in chronic obstructive pulmonary disease. **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**, v. 116, p. 1055-1062, 2012.

ROCHA, M. E. et al. Oxidative damage to ferritin by δ -aminolevulinic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 409, p. 349-356, 2003.

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

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

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

SCARANO, W. R. **Colapso dos mecanismos normais de controle da proliferação e maturação das células.** Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/carcinogenese-neoplasia>>. Acesso em 27 ago. 2014.

SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, p. 77-98, 2007.

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

SCHMATZ, R. et al. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. **Brain Research Bulletin**, v. 80, p.371-376, 2009.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimica**, v. 94, p. 374-383, 2012.

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

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

SEVIGNY, J. **Topografia de membrana das diferentes famílias de enzimas que compõem o grupo das ectonucleotidasas.** Disponível em: <www.crrri.ca/sevigny.html>. Acesso em 11 jan. 2014

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

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

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

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

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

SOTIRIOU, C. et al. Interleukins-6 and -11 expression in primary breast cancer and subsequent development of bone metastases. **Cancer Letters**, v. 169, p. 87-95, 2001.

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

SOUZA, J. B. A. **Análise da atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase no diabetes mellitus e no hipotireoidismo**. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SPANEVELLO, R. M. et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **Journal of Neurology**, v. 257, p. 24–30, 2010.

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

SPYCHALA, J.; KITAJEWSKI, J. Wnt and b-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. **Experimental Cell Research**, v. 296, p. 99-108, 2004.

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

STEGNER, D.; NIESWANDT, B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, p. 109-121, 2011.

STEGNER, D.; DÜTTING, S.; NIESWANDT, B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. **Thrombosis Research**, v.133, p. 149-157, 2014.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*, v. 26, p. 54-74, 2014.

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

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

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

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

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

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

VARKI, A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. **Blood**, v. 110, p.1723-1729, 2007.

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

VINAS, G.; PUIG, T.; PORTA, R. Oxidative stress in patients with cancer: two sides of the same coin. **Medicina Clinica**, v. 139, p. 171-175, 2012.

WAN, S. et al. Preoperative platelet count associates with survival and distant metastasis in surgically resected colorectal cancer patients. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 44, p. 293-304, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

YU, Y. et al. Gender susceptibility for cigarette smoking-attributable lung cancer: A systematic review and meta-analysis. **Lung Cancer**, v.85, p.351-360, 2014.

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

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

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v.66, p. 40-45, 2012.

ZANINI, D. et al. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 374, p. 137-148, 2013.

ZANINI, D. et al. Y-aminolevulinate dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, p. 603-609, 2014.

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

ZHAO, Y. et al. Increase in thiol oxidative stress via glutathione reductase inhibition as a novel approach to enhance cancer sensitivity to X-ray irradiation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 176-183, 2009.

ZHU, X. W. et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research**, v. 10, 2008.

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

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

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

ZUCHELLA, M. et al. Human tumor cells cultured "in vitro" activate platelet function by producing ADP or thrombin. **Haematologica**, v. 74, p. 541-545, 1989.

APÊNDICES

APÊNDICE A

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

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

Telefone para contato: (55) 3220-9557

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

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

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

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

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

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

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

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

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

mariaschetinger@gmail.com

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

