

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE
HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE
ADENINA EM PACIENTES COM MELANOMA
CUTÂNEO.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Mânica

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE
HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE
ADENINA EM PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO.**

Aline Mânica

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Maria Melchiors Morsch

Santa Maria, RS, Brasil
2015

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

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM
NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PACIENTES
COM MELANOMA CUTÂNEO.**

elaborada por
Aline Mânica

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini
(Presidente/Orientador)

Prof.^a Dr.^a Maribel Antonello Rubin/UFSM

Prof.^a Dr.^a Dalila Moter Benvegnú/UFSM

Santa Maria, 20 de agosto de 2015

AGRADECIMENTOS

Não sou muito boa com palavras, até porque não existem palavras que possam descrever a realização deste sonho.

A começar pelos meus pais Dalmir e Geni, que são a minha fonte de inspiração, meu porto seguro, meus exemplos de vida. Depois, um agradecimento especial para a minha orientadora e acima de tudo amiga Marga, que acreditou em mim, me deu coragem e me segurou a mão para que eu conseguisse seguir em frente no meu sonho. Minha irmã Alana e meu namorado Ricardo sempre muito parceiros e me incentivando nos momentos que eu pensava que não iria conseguir.

Quero agradecer a minha amiga e colega de laboratório Andréia por todo o tempo e atenção dispensada e pelo companheirismo e amizade.

Tenho muitas pessoas para agradecer, não vou nomear todas, mas quero que saibam que essa vitória não é só minha:

Minha família amada – vó, vô, tios, madrinhas, primos...

Pessoal do laboratório Enzitox, em especial as meninas que vão ficar para sempre no meu coração: Ani, Luana, Nathi, Karine, Diéssica, Pauline, Carla e Juci.

A professora Vera, minha coorientadora e professora Maria Rosa por me possibilitarem fazer parte do grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos.

Aos técnicos do laboratório de Chapecó, as meninas que me auxiliaram nas coletas e a minha fiel escudeira Alexsandra que todos os finais de semana, feriados e sempre que eu precisasse, estava pronta para me ajudar.

Meus agradecimentos ao Dr. Marcelo Moreno, que teve participação mais do que especial neste trabalho e a todos seus/nossos pacientes queridos.

Agradecer a CAPES pela bolsa concedida.

Aos professores e amigos da Unochapecó, que me apoiaram quando tomei a decisão de seguir em frente enfim, meu MUITO OBRIGADO a todos.

*“Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre...”*
Paulo Freire

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE HIDROLISAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO.

AUTORA: ALINE MANICA
ORIENTADORA: MARGARETE DULCE BAGATINI
COORIENTADORA: VERA MARIA MELCHORS MORSCH
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de agosto de 2015.

O Melanoma Cutâneo (MC) é considerado o responsável pela maioria das mortes relacionadas ao câncer de pele. A frequência de novos casos e a incidência é crescente, especialmente na população jovem. No Brasil as maiores taxas estão na região Sul em razão da composição da pele e os hábitos de sua população: uma maioria de caucasianos expostos à radiação solar intermitente sem fotoproteção. Os fatores de risco para o desenvolvimento do MC tanto podem ser genéticos, quanto ambientais, entretanto pesquisas recentes apontam que fatores ainda não estudados possam estar favorecendo o aumento do número de casos de MC nas últimas décadas. Células cancerígenas alteram e ativam vários mecanismos fisiológicos, dentre eles as plaquetas, que além da função de trombaregulação também estão envolvidas na progressão tumoral. Na superfície das plaquetas encontramos vários tipos de enzimas, entre elas as enzimas que fazem parte do sistema purinérgico. Sendo assim, neste trabalho avaliou-se a hidrólise dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina em pacientes com MC e pacientes controles, com o objetivo de elucidar como o sistema purinérgico está agindo neste câncer. Para isso, selecionou-se 23 pacientes com MC pós-tratamento e 25 pacientes controles. A média de idade para o grupo MC foi de 48 ± 12.5 anos e para o grupo controle foi de 47 ± 13 anos. A porcentagem de mulheres afetadas pelo câncer foi maior do que os homens: 65%. A grande maioria do grupo MC teve a remoção cirúrgica do tumor entre 2013-2014 e as partes mais afetadas do corpo foram os membros inferiores, superiores, tronco e cabeça. Foi analisada a atividade das enzimas que hidrolisam os nucleotídeos ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina através da atividade enzimática da E-NTPDase, E-5'-Nucleotidase, Adenosina Desaminase (ADA) em plaquetas, Fosfatase Alcalina (FAL) e ADA em soro e a expressão da E-NTPDase e da E-5'-Nucleotidase. Os resultados encontrados demonstraram uma diminuição na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em plaquetas de pacientes com MC quando comparados ao grupo controle e um aumento da hidrólise da adenosina pela ADA tanto em soro quanto em plaquetas de pacientes com MC. A atividade da FAL também foi aumentada nos pacientes com MC quando comparados aos pacientes controles. Para a expressão da E-NTPDase e E-5'-Nucleotidase não se observou diferença significativa entre os grupos. Conclui-se que ocorre um aumento nos níveis de ATP e uma diminuição nos níveis de adenosina, que pode conferir uma atividade protetora contra nova neoplasia, em virtude principalmente do papel estimulador do sistema imune pelo ATP.

Palavras-chave: Melanoma Cutâneo, Sistema Purinérgico, Ectonucleotidasas.

ABSTRACT

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

ASSESSMENT THAT ENZYME ACTIVITY THAT HYDROLISE NUCLEOTIDES AND ADENINE NUCLEOSIDE IN PATIENTS WITH CUTANEOUS MELANOMA.

AUTHOR: ALINE MANICA

ADVISOR: MARGARETE DULCE BAGATINI

CO-ADVISOR: VERA MARIA MELCHORS MORSCH

Date and Place of Defense: Santa Maria, August 20, 2015.

The Cutaneous Melanoma (CM) is considered responsible for most deaths related to skin cancer. The frequency of new cases and incidence is increasing, especially among young people. In Brazil the highest rates are in the South because individual tissue composition and the population habits: the majority of Caucasians exposed to intermittent solar radiation without sun protection. Risk factors for the development of CM can be both genetic, and environmental, but recent surveys show that factors not yet studied might be favoring an increase in the number of cases of MC in recent decades. Moreover cancer cells change and activate various physiological mechanisms, among them platelets, which besides the function tromboregulation are also involved in tumor progression. In the platelet surface we meet various enzymes, among them enzymes that are part of the purinergic system. Thus, this study evaluated the hydrolysis of nucleoside and nucleotides adenine in MC patients and controls, in order to elucidate how the system is acting purinergic this cancer. Furthermore we selected 23 patients with post-treatment CM and 25 control patients. The average age for the CM group was 48 ± 12.5 years and for the control group was 47 ± 13 years. The percentage of affected women was higher than men: 65%. The majority of the MC group had surgical removal of the tumor among 2013-2014 and the most affected body parts were the lower and upper limbs, trunk and head. Were analyzed the activity of enzymes that hydrolyze nucleotides ATP, ADP and AMP and the nucleoside adenosine through enzymatic enzymes activity E-NTPDase, E-5'-Nucleotidase, Adenosine Deaminase (ADA) in platelets, alkaline phosphatase (ALP) and ADA in serum and the E-NTPDase and E-5'-Nucleotidase expression. The results demonstrated a decrease in hydrolysis of the nucleotides ATP, ADP and AMP in platelet, and an increased adenosine hydrolysis by the ADA in both serum and platelets. The ALP activity was also increased in patients with CM when compared with control patients. For the expression E-NTPDase and E-5'-nucleotidase there was no significant difference between groups. Thus, in our study, was found a decrease extracellular ATP degradation rate, increased ADA activity in platelets and serum, being beneficial for patients with CM. So, concluded this way a protective activity against multiple primary neoplasms, by increasing extracellular ATP in patients who had surgical removal CM. The purinergic signaling would prevent the growth of a new tumor because ATP is not being degraded by promoting the platelet signaling to activate the lymphocyte immune response.

Keywords: Cutaneous Melanoma, Purinergic System, Ectonucleotidases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 –	Desenho esquemático do ciclo celular de uma célula normal.....	13
FIGURA 2 –	Desenho esquemático do ciclo celular de uma célula tumoral.....	14
FIGURA 3 –	Estimativa para o ano de 2014/2015 das taxas brutas de incidência (cada 100.000 habitantes) e do número de novos casos de câncer segundo sexo na região sul do Brasil.....	16
FIGURA 4 –	Representação espacial das taxas brutas de incidência de MC para o ano de 2014/2015 – cada 100mil habitantes.....	17
FIGURA 5 –	Ectonucleotidases ancoradas à membrana celular e seus domínios transmembrana.	26
QUADRO 1 -	Fototipos de pele, segundo classificação de Fitzpatrick.....	21

MANUSCRITO

FIGURE 1 –	NTPDase (ATP and ADP) and 5'-nucleotidase (AMP) activities in platelets of CM patients and control group. Bars represent means \pm SEM. * ** ***Represents statistical difference from the control group ($p < 0.05$).....	42
FIGURE 2 –	ADA activity in platelets and serum of Cutaneous Melanoma patients. Bars represent means \pm SEM. * ** ***Represents statistical difference from the control group ($p < 0.05$).....	43
FIGURE 3 –	ALP activity in serum of CM patients and control group. Bars represent means \pm SEM. * ** ***Represents statistical difference from the control group ($p < 0.05$).....	44
FIGURE 4 –	Percentage of CD39 and CD73 positive cells from patients with CM when compared to the control group. Bars represent means \pm SEM..	45

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABLE 1 -	Clinical characteristics of the control group and Cutaneous Melanoma patients.....	41
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
ADA	Adenosina desaminase
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofostato de adenosina
5'AMPc	5' Monofosfato de adenina ciclíco
ATP	Trisfosfato de adenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E-NPP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
FAL	Fosfatase alcalina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LS	Linfonodo Sentinela
MC	Melanoma Cutâneo
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
mm	Milímetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
P_i	Fosfato inorgânico
PP_i	Difosfato inorgânico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina-5'-trifosfato
UV	Ultravioleta

LISTA DE APÊNDICES

APENDICE A - Ficha de coleta: pacientes com melanoma cutâneo.....	56
APENDICE B - Ficha de coleta: pacientes saudáveis – controles.....	57
APENDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	58

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer consubstanciado do CEP.....	62
--	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. METODOLOGIA E RESULTADOS	30
4. CONCLUSÃO	52
APÊNDICES	59
Apêndice A	59
Apêndice B	60
Apêndice C	61
ANEXOS	63
Anexo 1: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	63

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos de diferentes doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com origem multifatorial (SIEGEL et al., 2014). É caracterizado por alterações na expressão de múltiplos genes, levando a desregulação da divisão e diferenciação celular (RUDDON, 2007).

A divisão celular é um processo muito importante para as células, pois os mecanismos envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna interferem na divisão celular. Sendo assim, o conhecimento do ciclo celular e seus mecanismos são importantes para que haja a compreensão da etiologia do câncer (RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1994; ALMEIDA et al., 2005).

O ciclo celular é formado por várias fases. A célula que não está replicando apresenta-se na fase G₀ (ALMEIDA et al., 2005). Nesta fase, o DNA apresenta-se super-enovelado e tem atividade nuclear baixa. Este estágio pode ser modificado para a fase G₁, onde há a preparação da célula para a multiplicação que ocorrerá na fase S (Figura 1) (ALMEIDA et al., 2005; RUDDON, 2007). Nas fases G₁ e S existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular (ALMEIDA et al., 2005; RUDDON, 2007). Os fatores de crescimento, como os produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (“feedback”) são inibidores da multiplicação celular (RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1994).

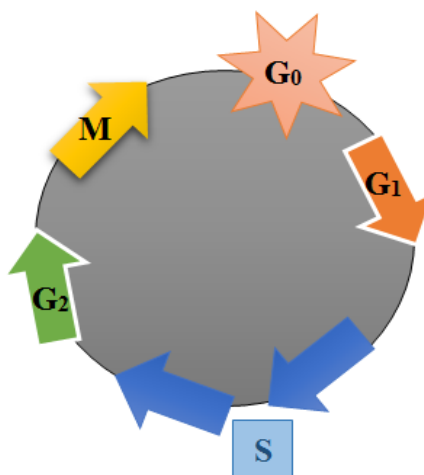


Figura 1: Desenho esquemático do ciclo celular de uma célula normal. Elaborado pela autora.

Na fase G2 há a síntese de componentes para a mitose como a produção do fuso mitótico que é feito na fase M (RUDDON, 2007). Após a cariocinese, divisão do material nuclear ocorre a citocinese, divisão do citoplasma e da célula como um todo, finalizando o ciclo de replicação celular (Figura 1) (RUDDON, 2007). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular, ou seja, não retorna à fase G0 e assim passa da fase M para nova fase G1 (Figura 2) (ALMEIDA et al., 2005; RUDDON, 2007).

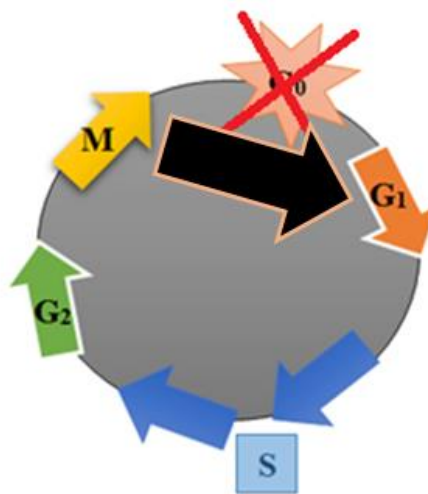


Figura 2: Desenho esquemático do ciclo celular de uma célula tumoral. Como observado, a célula maligna passa diretamente da fase M para G1. Elaborado pela autora.

O processo de carcinogênese se desenvolve lentamente e pode levar vários anos para que uma célula cancerígena se prolifere dando origem a uma massa tumoral detectável. Esse processo ocorre através de diferentes estágios: iniciação, promoção e progressão tumoral (VALKO et al., 2006). No primeiro estágio da carcinogênese – iniciação - há uma modificação nos genes das células. No segundo estágio – promoção - as células alteradas sofrem o efeito dos agentes oncopromotores e a célula iniciada é transformada em célula maligna de forma lenta e gradual. Já o estágio de progressão, que é o terceiro e último estágio, caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer então já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA et al., 2005; VALKO et al., 2006; RUDDON, 2007).

Os fatores de risco para desenvolvimento do câncer podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser hereditários (ALMEIDA et al., 2005). A maioria dos

casos (cerca de 80%) está relacionada ao meio ambiente, onde encontramos um grande número de fatores de risco, tais como uso e exposição aos agrotóxicos, radiação ultravioleta (UV) dentre outros (RUDDON, 2007).

O câncer é o maior problema de saúde pública nos Estados Unidos e em muitas outras partes do mundo, como no Brasil e, por isso, seu controle e prevenção devem ser priorizados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; FACINA, 2014; SIEGEL et al., 2014). De acordo com dados do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer e da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes em todo o mundo, em 2012. Em 2030, o número estimado é de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por essa doença, em consequência principalmente do crescimento e do envelhecimento da população (INCA, 2014).

O Ministério da Saúde presume que para 2014/2015 aproximadamente 576 mil novos casos de câncer serão diagnosticados no Brasil, incluindo os cânceres de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (FACINA, 2014). Considerando-se esse alto número de casos de câncer no Brasil, torna-se de fundamental importância o estudo do câncer de pele, principalmente o Melanoma Cutâneo (MC) por ser a forma mais agressiva e letal desses tipos de canceres.

As formas mais comuns de câncer de pele não melanoma são o carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas, ambos altamente curáveis. Esses cânceres são chamados de não melanoma por que se desenvolvem a partir de outros tipos de células que não são os melanócitos da epiderme (RONG et al., 2015). A figura 3 confirma a elevada incidência de câncer de pele não melanoma em homens e em mulheres na região sul do Brasil de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e do Ministério da Saúde.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	12.830	91,24	1.840	102,92	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	10.370	70,98	2.240	112,73
Colo do Útero	-	-	-	-	2.320	15,87	340	17,42
Traqueia, Brônquio e Pulmão	4.720	33,62	600	33,84	3.110	21,35	540	27,30
Cólon e Reto	2.870	20,43	780	43,64	3.190	21,85	950	47,98
Estômago	2.260	16,07	280	15,31	1.230	8,43	190	9,96
Cavidade Oral	2.140	15,21	250	14,06	450	3,09	130	6,22
Laringe	1.290	9,21	140	7,82	130	0,85	30	0,74
Bexiga	1.270	9,10	240	13,48	480	3,29	90	4,24
Esôfago	2.250	15,97	170	9,37	770	5,27	60	2,55
Ovário	-	-	-	-	960	6,63	210	10,74
Linfoma de Hodgkin	260	1,78	40	2,03	150	1,03	30	10,09
Linfoma não Hodgkin	980	6,90	240	13,70	820	5,61	270	13,85
Glândula Tireoide	480	3,43	50	2,57	2.360	16,15	160	8,43
Sistema Nervoso Central	1.230	8,72	140	7,77	860	5,90	140	7,31
Leucemias	1.140	8,13	180	9,70	920	6,30	150	7,58
Corpo do Útero	-	-	-	-	910	6,30	230	11,69
Pele Melanoma	920	6,55	160	9,23	880	6,03	180	8,90
Outras Localizações	9.470	67,30	1.390	78,21	7.320	50,10	1.080	54,91
Subtotal	44.110	313,63	6.500	365,55	37.230	254,94	7.020	353,34
Pele não Melanoma	22.430	159,51	1.060	59,32	12.560	86,03	1.430	72,26
Todas as Neoplasias	66.540	473,11	7.560	425,16	49.790	340,95	8.450	425,32

Figura 3: Estimativa para o ano de 2014/2015 das taxas brutas de incidência (cada 100.000 habitantes) estado e capitais e número de novos casos de câncer segundo sexo na região sul do Brasil. Adaptado de INCA, 2014.

Já o MC apesar de representar menos de 10% dos cânceres de pele, é considerado o responsável pela maioria das mortes relacionadas com esse tipo de câncer (PASTUSHENKO, 2014). A frequência de novos casos dobra a cada 10 - 15 anos e a incidência é crescente, especialmente na população jovem. O número de vidas perdidas pela morte por MC é, portanto, excessivamente maior do que para outras doenças malignas, tornando-se um importante problema de saúde pública (DIMATOS et al., 2009; RASTRELLI et al., 2013; PASTUSHENKO, 2014).

A incidência mundial de MC está aumentando mais rápido do que qualquer outro tumor sólido. De acordo com o National Cancer Institute, globalmente cerca de 160.000 novos casos por ano, com 48.000 mortes são registradas (EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014).

No Brasil as maiores taxas de MC estão na região Sul como mostrado na figura 4 (MORENO et al., 2012). A faixa territorial brasileira que compreende os estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul está entre os paralelos 26° e 31°. Entre esses mesmos paralelos, encontra-se a Austrália, país onde são registrados

os maiores índices de prevalência e incidência de MC do planeta – 56 casos a cada 100.000 habitantes/ano para homens e 41 casos a cada 100.000 habitantes/ano em mulheres (MORENO et al., 2012; EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014). Entre as razões para a elevada prevalência de MC na região sul do Brasil estão a composição da pele e os hábitos de sua população: uma maioria de caucasianos expostos à radiação solar intermitente sem a fotoproteção adequada (BATISTTI et al., 2009; DIMATOS et al., 2009).

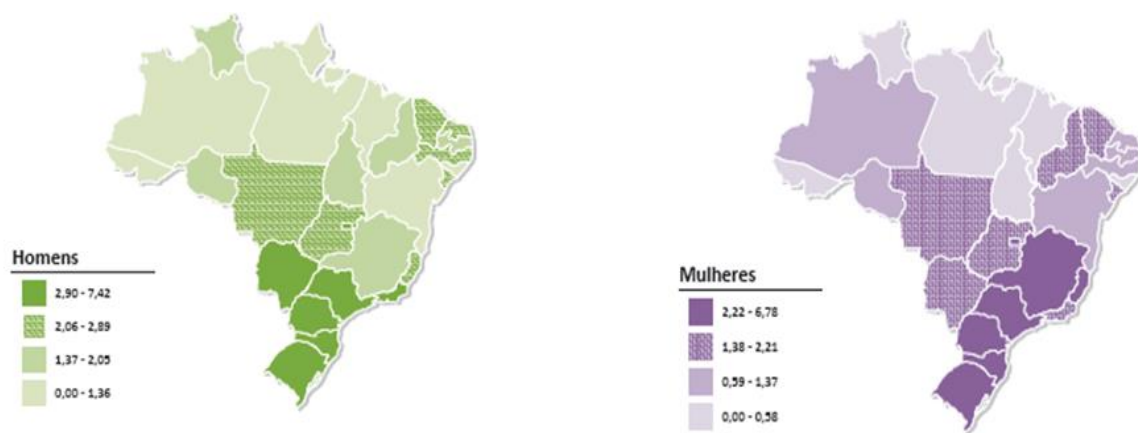


Figura 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência de MC para o ano de 2014/2015 – cada 100mil habitantes. Adaptado de Ministério da Saúde, 2014.

O INCA estima para 2014 e 2015, que sejam diagnosticados 5.890 novos casos de câncer de pele tipo MC (2.960 em homens e 2.930 em mulheres) no Brasil. No Brasil, a notificação compulsória dos casos de câncer ainda não é uma realidade, ocorrendo em apenas 30% do país. Por esta razão, a existência de um número considerável de subregistros é possível e o número de casos de MC pode ser ainda maior (MORENO et al., 2012; INCA, 2014).

Nas escrituras de Hipócrates foi aonde surgiu a primeira descrição que faz referência ao MC, durante o período 460 a 375 a.C. No entanto, em 1838, Robert Carswell, o utilizou para descrever lesões malignas pigmentadas da pele (WAINSTEIN; BELFORT, 2004). O MC forma-se a partir da transformação maligna dos melanócitos e envolve principalmente fatores ambientais e genéticos. Desenvolve-se em diferentes partes do corpo (em regiões expostas e não expostas

ao sol) por combinar efeitos mitogênicos e genotóxicos nos melanócitos, bem como escape do sistema imune (BERTOLOTTO, 2013).

A pele é uma barreira passiva contra lesões, evita perda de fluídos e impede a entrada de agentes tóxicos, dentre outras funções. É formada pela epiderme, derme e hipoderme cada qual constituída por diferentes tipos celulares (MITCHELL, 2006). A epiderme contém dois tipos de células dendríticas, as células de Langerhans e os melanócitos. As células de Langerhans são células dendríticas processadoras de antígenos e os melanócitos são as células produtoras do pigmento melanina (BANDARCHI et al., 2010).

O pigmento melanina é sintetizado em organelas especiais, chamadas de melanossomas, em uma cascata enzimática envolvendo principalmente a tiroquinase e suas proteínas. Dois tipos de pigmentos são produzidos, o marrom/preto que exibe características fotoprotetoras e o laranja/amarelo que tem fraca propriedade fotoprotetora (BANDARCHI et al., 2010; BERTOLOTTO, 2013). A melanina fornece uma eficiente proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta, por reduzir o dano causado ao DNA e instabilidade genômica causados pela radiação (BERTOLOTTO, 2013).

O MC, forma mais letal de câncer de pele, é resultante da transformação de melanócitos em 75% dos casos e de nevos ou seja, manchas ou sinais preexistentes em 25% dos casos (BERTOLOTTO, 2013). Pode surgir dentro de qualquer território anatômico ocupado por melanócitos, sendo que a pele é o local mais comum de origem. Porém, melanócitos não cutâneos, como os que revestem a camada coróide do olho, trato respiratório, trato gastrointestinal e das mucosas do trato geniturinário ou as meninges, ocasionalmente também podem sofrer transformação maligna (ainda que em uma frequência baixa) (TSAO, 2012).

MC malignos típicos geralmente se apresentam assimétricos, com irregularidades da borda, variação de cor e diâmetro superior a 6 mm³. No entanto, muitas exceções e variações podem ocorrer (BANDARCHI et al., 2010).

O MC pode ser dividido em quatro principais subtipos, de acordo com suas características: extensivo superficial, nodular, lentigo maligno e acral (GARBE et al., 2012). O extensivo superficial é o tipo mais comum (aproximadamente 70% dos casos), tem crescimento horizontal e vertical, aparecendo primeiramente como uma mácula que lentamente evolui para uma placa. Geralmente tem várias colorações com áreas mais pálidas de regressão (GARBE et al., 2012).

O segundo tipo, melanoma nodular, geralmente tem coloração marrom/preta, com sangramento característico de uma agressiva invasão tecidual (BANDARCHI et al., 2010). O lentigo maligno aparece mais em pessoas idosas e em áreas expostas ao sol durante muitos anos. É caracterizado por uma lenta proliferação de melanócitos atípicos (GARBE et al., 2012). O último tipo de MC a ser citado é o melanoma acral, é tipicamente desenvolvido em áreas palmoplantares ou sublingual. A lesão é irregular de bordas indefinidas e pouca pigmentação (BANDARCHI et al., 2010; GARBE et al., 2012).

Diferenciar os vários estágios do MC, bem como seus tipos tem um papel fundamental em termos de prognóstico (MERVIC, 2012). Através da portaria nº 357, de 8 de abril de 2013 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), estabeleceu-se as diretrizes diagnósticas e terapêuticas do melanoma maligno cutâneo. Segundo essa portaria, a profundidade (invasão) do tumor é um determinante fundamental do prognóstico e do tratamento e é descrita de duas maneiras: pelo índice de Breslow, que avalia a profundidade do tumor em milímetros e o nível de Clark, que descreve a invasão neoplásica em cinco níveis em relação às camadas da pele:

- Nível I: o tumor envolve somente a epiderme;
- Nível II: o tumor envolve a epiderme e parte da derme papilar;
- Nível III: o tumor preenche a derme papilar;
- Nível IV: o tumor envolve a derme reticular;
- Nível V: o tumor invade as camadas de gordura da pele - a hipoderme.

A determinação da espessura do tumor foi introduzida pela primeira vez por Breslow em 1970 e logo foi utilizado como um ótimo recurso de prognóstico para MC (MERVIC, 2012). Pacientes com tumores mais finos do que 0,76 milímetros (mm) foram designados pacientes de baixo risco, pois raramente vão gerar metástase. Pacientes de risco intermediário o MC tem espessura de 0,76 até 1,5 mm e de alto risco a espessura de 1,5 até 4,0 mm. Para pacientes com tumores mais espessos que 4,0 mm o risco de gerar metástase é altíssimo (MERVIC, 2012).

O MC mostra graus variados de infiltrado linfocitário, principalmente na fase radial de crescimento (infiltrado liquenóide) ou podem estar limitados à periferia do tumor (peritumoral). A presença de linfócitos invadindo o tumor associa-se a prognóstico mais favorável (WEBER et al., 2006). Outra característica importante em

relação ao prognóstico de MC é o mapeamento linfático pela biópsia do linfonodo sentinela (LS), que com grande acurácia indica o estadiamento dos linfonodos regionais à lesão (WEBER et al., 2006).

O estudo do LS tem amplo impacto no estadiamento e prognóstico de diversos tumores, incluindo o MC, e têm sido amplamente empregado na última década. Corresponde ao primeiro linfonodo da base linfática que recebe a drenagem do local de implantação tumoral e permite predizer o estado de toda essa cadeia (LAGES et al., 2011; SAPIENZA et al., 2014). Além de ser uma técnica melhor do que a ressecção de toda a cadeia linfática, a melhoria no estadiamento e informações prognósticas obtidas a partir da detecção do LS em pacientes com MC explicam a rápida aceitação e disseminação dessa técnica (SAPIENZA et al., 2014).

O tratamento inicia-se pela ressecção com margens amplas do tumor, que pode ser curativa se a doença estiver localizada. Em lesões de maior espessura há maiores chances de envolvimento ganglionar, sendo que a remoção de toda a cadeia linfática torna-se necessária para complementar o tratamento destes pacientes (SAPIENZA et al., 2014).

Em relação aos fatores de risco, fatores constitucionais e ambientais estão associados ao aparecimento do MC (BANDARCHI et al., 2010). Há uma complexa interação do ambiente e fatores endógenos no seu desenvolvimento: até 65% dos melanomas malignos estão relacionadas à exposição intermitente a radiação UV. Porém, o melanoma nodular e o melanoma acrolentiginoso parecem ter pouca relação com a exposição solar. Para esses dois tipos de melanoma, os principais fatores de risco são o número de nevos melanocíticos na pele, tipo de pele, história familiar e susceptibilidade genética (RASTRELLI et al., 2013).

Entre os fatores de risco constitucionais podemos citar às manifestações objetivas de cor de pele, cabelo e olhos. Essas características estão diretamente relacionadas com a capacidade de proteger contra os raios UV, muito conhecidos por provocar alterações no DNA e aumentar o risco de câncer (BANDARCHI et al., 2010; BERTOLOTTI, 2013; MARTINS-COSTA, 2013). Fototipos I e II de Fitzpatrick, ou seja, indivíduos que apresentam pele, cabelos e olhos claros e se queimam facilmente ao invés de se bronzear, tem alta probabilidade de desenvolver MC (Quadro 1). A presença e o número de nevos melanocíticos congênitos e adquiridos, comuns ou displásicos, são também fatores de risco muito importantes

em pessoas de pele clara somado a um histórico pessoal e familiar de MC (GANDINI et al., 2005; BERTOLOTTO, 2013; MARTINS-COSTA, 2013).

Conforme a quantidade de melanina na pele, os pacientes são divididos em seis fototipos diferentes - classificação de Fitzpatrick - (Quadro 1) e conforme o fototipo terão mais ou menos chances de desenvolver MC.

Quadro 1: Fototipos de pele, segundo classificação de Fitzpatrick (Adaptado de FITZPATRICK; HAYNES, 1984).

	Fototipo I	Fototipo II	Fototipo III	Fototipo IV	Fototipo V	Fototipo VI
Fototipo (pele)	Branca	Branca	Morena Clara	Morena Moderada	Morena escura	Negra
Sensibilidade ao sol	Muito sensível	Sensível	Normal	Normal	Pouco sensível	Insensível
Características	Queima com facilidade e nunca bronzeia	Queima com facilidade e bronzeia pouco	Queima e bronzeia moderadamente	Queima pouco e bronzeia com facilidade	Queima raramente e bronzeia bastante	Nunca queima. Pele totalmente pigmentada

A contagem total de nevos também está relacionada com o risco de desenvolver MC: pacientes com mais de 100 nevos no corpo têm um aumento de sete vezes no risco para desenvolver MC (RASTRELLI et al, 2013).

O uso de camas de bronzeamento também é um fator de risco importante para o seu desenvolvimento bem como mutações nos genes CDKN2A, CDK4, BRAF e MC1R. Essas mutações genéticas foram detectadas em algumas famílias com melanoma hereditário e foram associadas com o seu desenvolvimento. O MC afeta principalmente a faixa etária dos 30 aos 60 anos e acomete ambos os sexos em igual proporção, sendo no homem mais comum no dorso e, na mulher, nos membros inferiores (MARTINS-COSTA, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Após o diagnóstico de um MC, aproximadamente 3% dos pacientes irão desenvolver um segundo MC num período de três anos. O risco pode ser maior em pacientes com historia familiar, chegando a 33% de incidência de um segundo MC

num período de até cinco anos (OLIVEIRA FILHO et al., 2003). Pacientes nos primeiros estágios de invasão podem normalmente ser curados com a excisão cirúrgica. Sua taxa de sobrevivência em 5 anos varia de 90% a 100%. No entanto, o prognóstico piora quanto mais profunda a lesão se estender, devido à maior propensão à metástase (BERTOLOTTI, 2013).

Pacientes afetados por doenças neoplásicas, como o MC, apresentam uma série de mudanças fisiológicas, incluindo alterações nos processos tromboembólicos, mediados pelas plaquetas (ZANINI et al., 2012). As células tumorais interagem com todos os componentes do sistema hemostático e essa interação tem sido associada a passos-chave na progressão do câncer, considerando que os vasos sanguíneos são as principais vias anatômicas para a disseminação de células cancerosas (JURASZ; ALONSO-ESCOLANO; RADOMSKI, 2004; BAMBACE; HOLMES, 2011).

As plaquetas são células efetoras da hemostasia altamente especializadas, desempenhando diversas funções, tais como: adesão, agregação e formação do “tampão” hemostático. Além disso, participam de processos adicionais, como em processos inflamatórios, de reparo vascular e tecidual e na modulação do sistema imunológico (OLIVEIRA et al., 2013).

Alguns dos principais componentes estruturais de plaquetas e de seus receptores, que contribuem para a hemostasia, também foram relacionados com a progressão maligna. Como exemplo, os receptores de plaquetas GPIIb/IIIa que podem mediar a liberação de proteína angiogênica além do seu papel tradicional na ligação do fibrinogênio (BAMBACE; HOLMES, 2011).

Podem-se citar várias descobertas pertinentes às influências das plaquetas em processos considerados como não tradicionais: capacidade de sintetizar proteínas, mecanismos inesperados de *splicing*, processo de morte celular (anuclear) programada, envolvimento de plaquetas na sinalização de células-tronco e reparo vascular (OLIVEIRA et al., 2013).

Além de contribuir nas interações entre as células, as plaquetas podem influenciar na metástase de células de MC. O estudo de Lonsdorf e colaboradores (2012) demonstrou a importância da interação entre as células de melanoma e plaquetas para formação de metástases celulares através da interação do receptor GPIIb/IIIa com essas células tumorais.

Muitos estudos experimentais utilizando ensaios *in vitro* e em *in vivo* têm demonstrado uma forte ligação entre a disseminação de células tumorais e a ativação de plaquetas (LI et al., 2014). A progressão de tumores e metástases estão fortemente relacionados com a maturação dos vasos sanguíneos e estabilização no microambiente tumoral. As plaquetas estão envolvidas na maturação dos vasos por meio de vários mecanismos, incluindo a liberação de fatores derivados das plaquetas e citocinas que regulam o recrutamento de células derivadas de medula óssea (LI et al., 2014).

As células tumorais podem ativar as plaquetas através de vários mecanismos. A liberação de difosfato de adenosina (ADP) extracelular - potente agonista de ativação plaquetária, é um destes mecanismos (OLAS; WACHOWICZ; MIELICKI, 2001). A liberação de nucleotídeos como o trifosfato de adenosina (ATP), ADP e monofosfato de adenosina (AMP) para o meio extracelular caracteriza um sistema de sinalização específica. Quando estas moléculas estão no ambiente extracelular fazem parte da sinalização chamada "purinérgica" entre as células. Pesquisas recentes apontam que fatores ainda não estudados possam estar favorecendo o aumento do número de casos de MC nas últimas décadas e entre esses fatores, questiona-se o envolvimento do sistema purinérgico - complexo sistema envolvido em várias doenças e alterações metabólicas (RASTRELLI et al., 2013).

O papel extracelular das purinas foi primeiramente demonstrado em 1929 por Drury e Szent-Györgyi, que descreveram suas potentes ações no coração dos mamíferos (BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2009). Em 1959, Holton sugeriu que o ATP poderia atuar como um mensageiro neuronal durante uma estimulação que induziria a alterações no tônus vascular. O termo "sinalização purinérgica" foi designado para descrever esse sistema mensageiro (SHABBIR; BURNSTOCK, 2009) e quem introduziu o conceito de transmissão purinérgica foi Burnstock em 1972 (BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2009). Mais tarde, foi proposto que o ATP atua como co-transmissor no Sistema Nervoso Central (SNC), atuando em conjunto com neurotransmissores. Hoje, já é estabelecido que o ATP age como neurotransmissor tanto no SNC quanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP) (BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2009).

Os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina 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 da dor e inflamação, contração do músculo liso, neurotransmissão, secreção endócrina e exócrina, resposta imune, agregação plaquetária e modulação da função cardíaca (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Já a atividade anticancerígena de nucleotídeos de adenina foi primeiramente descrita por Rapaport em 1983, que descobriu que a injeção intraperitoneal de ATP em ratos portadores de um tumor resultou em significativa atividade contra o crescimento de carcinomas mais agressivos (WHITE et al, 2005). A adição de ATP exógeno inibiu o crescimento de células de câncer de cólon e adenocarcinoma pancreático, por inibir o ciclo celular na fase S. Em contraste, a adenosina tem sido associada como promotora de crescimento tumoral (SPYCHALA et al., 2000).

As funções citoprotetoras da adenosina no organismo incluem a estimulação da angiogênese e inibição das reações inflamatórias locais. No câncer, ela tem funções semelhantes, mas que beneficiam a malignidade proporcionando um ambiente favorável para o seu crescimento acelerado: proteção contra a isquemia, estimulação do crescimento e angiogênese, e supressão de respostas imunes (SPYCHALA et al., 2000).

A liberação do ATP para o espaço extracelular está envolvido no metabolismo celular do câncer e na imunidade antitumoral e sua acumulação no espaço extracelular terá efeito positivo ou negativo dependendo da sua concentração, taxa de degradação e a expressão dos receptores P2 pelas células cancerígenas e pelas células inflamatórias infiltrantes, pois o ATP tem uma função imunomoduladora no microambiente tumoral (DI VIRGILIO, 2012).

O ATP liberado em um meio com células tumorais se acumula em grandes concentrações extracelularmente e, além de atuar como sinal de perigo também pode matar as células tumorais adjacentes via ligação aos receptores P2X7 (FENG et al., 2011). A liberação do ATP extracelular pelas células tumorais de uma linhagem de melanoma (B16) contribuiu para o recrutamento e a estimulação de células T reguladoras, resultando em um ambiente imunossupressor (RING; ENK; MAHNKE, 2011).

No estudo feito por Aghaei e colaboradores (2005) em pacientes com câncer de mama, foi observado um aumento na hidrólise da adenosina nos pacientes com câncer. Esse aumento de hidrólise indicaria uma maior proliferação do tumor, ou seja, suas atividades mais baixas são a favor de um melhor prognóstico. Maldonado

e colaboradores (2012) ao estudarem o papel do sistema purinérgico em pacientes com câncer de útero e neoplasia cervical verificaram a influência do mesmo nessas neoplasias e em seus diferentes estágios de desenvolvimento, observando que a hidrólise do ADP e do AMP foram variáveis frente aos diferentes estágios do câncer enquanto que o ATP que teve seus níveis diminuídos em todas as etapas avaliadas nos pacientes quando comparado com grupo controle. O sistema purinérgico além dos tumores já citados foi encontrado alterado em outros tipos de tumores, tais como o câncer de pulmão (ZANINI et al., 2012).

A liberação e a concentração extracelular dos nucleotídeos são influenciadas por vários fatores, tais como: secreção ou lise celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática, exocitose de vesículas secretoras (corpos densos plaquetários) e ação catalítica de enzimas (BURNSTOCK, 2008; ZIMMERMANN, 2001).

Para controlar o nível de tais moléculas, o organismo apresenta um conjunto de enzimas denominadas de ectonucleotidases (WHITE et al, 2005; DI VIRGILIO, 2012; MALDONADO et al, 2012). As ectonucleotidases incluem: Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDases/CD39), E-5'-Nucleotidase (CD73), Ecto-Nucleotídeo Pirofosfato/Fosfodiesterase (E-NPP) e a Fosfatase alcalina (FAL) (ZIMMERMANN, 2001; CARDOSO et al., 2015).

A E-NPP hidrolisa o ATP a AMP diretamente; já a E-NTPDase hidrolisa ATP para ADP bem como ADP para AMP. A E-5'-Nucleotidase hidrolisa o AMP a adenosina (WHITE; BURNSTOCK, 2006; DI VIRGILIO, 2012; MALDONADO et al, 2012). O nucleosídeo adenosina é então convertido pela enzima Adenosina Desaminase (ADA) em inosina e hipoxantinas (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; YEGUTKIN, 2011). A ADA e as ectonucleotidases são enzimas de membrana que têm a capacidade de controlar os níveis de nucleotídeos na circulação (GODINGA; GROBBENB; SLEGGERSB, 2003).

As E-NPPs são glicoproteínas transmembrana tipo II, capazes de hidrolisar 3'-5'-monofosfato de adenosina cíclico (5'-AMPc) a AMP; ATP a AMP e difosfato inorgânico (PPi); ADP a AMP e fosfato inorgânico (Pi); nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD⁺) a AMP e nicotinamida mononucleotídeo (ZIMMERMANN, 2001). Embora essa família de enzimas seja composta por 7 membros, apenas a E-NPP 1, 2 e 3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

As E-NTPDases são enzimas muito eficientes e controlam a biodisponibilidade de ATP (CARDOSO et al., 2015). Essa família de enzimas é constituída por oito membros – E-NTPDases 1 – 8 que diferem entre si quanto à especificidade de substrato, distribuição tecidual e localização tecidual (ZIMMERMANN, 2001). Os membros 1, 2, 3 e 8 são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatos na superfície da célula sob condições fisiológicas. As E-NTPDases 4, 5, 6 e 7 estão principalmente associadas com organelas intracelulares (ZIMMERMANN, 2001). Essa classe de ectoenzimas está ancorada à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos com o sítio ativo voltado para o meio extracelular (Figura 5) (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

A família das E-5'-Nucleotidase tem sete membros, seis citosólicos e uma ectoenzima, a E-5'-Nucleotidase, que também está ancorada à membrana plasmática. Essa enzima gera adenosina extracelular a partir do AMP, como já citado anteriormente. Na maioria dos tecidos, sua atividade é o passo limitante da velocidade de formação de adenosina a partir de nucleotídeos de adenina (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; CARDOSO et al., 2015).

As FALs em condições alcalinas removem o Pi de uma ampla gama de substratos, incluindo os nucleotídeos (ATP, ADP e AMP). Uma única enzima pode assim, catalisar toda a cadeia de hidrólise a partir de um ATP para o respectivo nucleosídeo - adenosina. A FAL é ancorada à membrana similar às outras ectoenzimas (Figura 5) (ZIMMERMANN, 2001).

A ADA catalisa a desaminação de adenosina e desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina. Apesar de grande parte desta enzima estar presente no meio intracelular, ela também está localizada na superfície celular. É encontrada alterada em diversas situações patológicas, inclusive na presença de certos tumores (SPYCHALA, 2000).

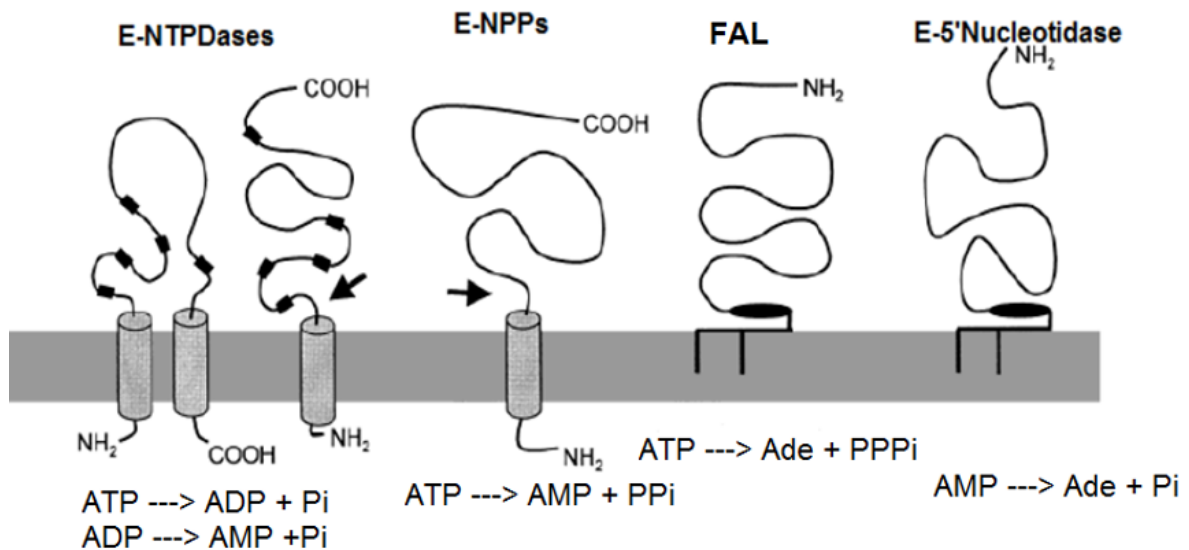


Figura 5: Ectonucleotidasas ancoradas à membrana celular e seus domínios transmembrana. Adaptado de Zimmermann (2001).

Os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina interagem com receptores purinérgicos específicos mediando eventos de resposta imune, inflamação, agregação plaquetária dentre outros (BURNSTOCK 2006). Sendo assim, os receptores do sistema purinérgico podem ser divididos em dois grupos principais: os receptores de adenosina, também chamados receptores P1 e os receptores P2, que reconhecem ATP, ADP, Uridina-5'-trifosfato (UTP), e Uridina difosfato (UDP) (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P1 foram subdivididos em quatro subtipos de acordo com suas características: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Baseado em diferenças de estrutura molecular e mecanismos de transdução de sinal, os receptores P2 também foram subdivididos em duas classes: canais iônicos e acoplados à proteína G. Os receptores P2 foram então denominados de receptores P2X e P2Y (sete receptores P2X – ligados a canais iônicos: $P2X_{1-7}$, e cinco receptores P2Y – à qual pertencem purinoreceptores metabotrópicos acoplados à proteína G: $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ e $P2Y_{11}$) (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Alguns subtipos de receptores de P2 ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_{11}$, $P2X_5$ e o $P2X_7$) têm sido implicados com envolvimento com o câncer: modulação da proliferação de células - receptores $P2Y_1$ e $P2Y_2$ - estimulação da diferenciação com a subsequente

inibição da proliferação - receptores P2X₅ e P2Y₁₁ - ou indução da morte celular (apoptose) - receptores P2X₇ (WHITE; BURNSTOCK, 2006).

Em relação aos receptores do sistema purinérgico, a função dos receptores P2Y em melanomas é regular a proliferação celular. Receptores P2Y₁ ativados causam uma diminuição no número de células, enquanto os receptores P2Y₂ ativados causam um aumento no número de células nesta patologia. Receptores P2Y₆ também estão presentes no MC, mas foi demonstrado não ter um efeito sobre o número de células, sugerindo-se então que eles podem estar desempenhando outro papel na regulação celular (WHITE; BURNSTOCK, 2006).

Apesar dos estudos e esforços que vem sendo realizados, envolvendo o sistema purinérgico e suas ações celulares, faltam, ainda, estudos para entender como as enzimas do sistema purinérgico estão agindo no desenvolvimento do MC, e como os nucleosídeos e o nucleotídeo de adenina se comportam nesta doença. Portanto, considerando que este é o primeiro estudo que relaciona o envolvimento do sistema purinérgico e o MC com humanos, que é um câncer muito agressivo, com alta letalidade e que está aumentando muito sua incidência em pessoas cada vez mais jovens, é de fundamental importância entender sua fisiopatologia e o envolvimento do sistema purinérgico no mesmo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina em plaquetas e soro de pacientes com Melanoma Cutâneo.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-Nucleotidase e ADA em plaquetas de pacientes com remoção cirúrgica do MC e em pacientes controles;
- Verificar a expressão das enzimas E-NTPDase e E-5'-Nucleotidase em plaquetas de pacientes com MC e pacientes controle através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD39, anti-CD73 e anti-CD61;
- Estudar a atividade da enzima ADA e FAL em soro de pacientes com MC e pacientes controle.

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um manuscrito. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O manuscrito está formatado de acordo com as normas para publicação da revista Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.

Manuscrito: EVALUATION OF ENZYMES THAT HYDROLYZE ADENINE NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDE IN CUTANEOUS MELANOMA PATIENTS.

**EVALUATION OF ENZYMES THAT HYDROLYZES ADENINE
NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDE IN CUTANEOUS MELANOMA
PATIENTS.**

Manica, Aline (1). Da Silva, Alexsandra (2). Cardoso, Andreia Machado (1). Moreno, Marcelo (3). Leal, Daniela B. (1). Maria Rosa Chitolina Schetinger (1). Vera Maria Morsch (1). Bagatini, Margarete Dulce (2)*.*

(1) Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, PPGBTIX, Santa Maria, Brasil.

(2) Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, Colegiado de Enfermagem, Campus Chapecó, Chapecó Brasil.

(3) Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECO, Curso de Medicina, Chapecó, Brasil.

Corresponding author:

*Margarete Dulce Bagatini, margaretebagatini@yahoo.com.br – 55 (49) 9919 4832

*Vera Maria Morsch, veramorsch@gmail.com - 55 (55) 3220 9557.

Abstract

Cutaneous melanoma (CM) is responsible for 75% of deaths from malignant skin cancer. The incidence of CM in the southern region of Brazil, particularly in the western region of Santa Catarina, is possibly higher than estimated in the others regions. Some signaling molecules are involved in the thromboregulation and modulation of immune responses in patients with this malignancy: the nucleotides and nucleoside of adenine. Thus, this study aims to determine adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) and adenosine hydrolysis in the platelets; CD39 and CD73 expression in platelets; alkaline phosphatase (ALP) and adenosine deaminase (ADA) activities in serum of patients with CM and controls.

Methods: We collected blood samples from CM patients (n = 23) previously excised CM by surgical and control patients (n = 25).

Results: CM patients showed a significant decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis when compared with control group ($p < 0,05$) and increase in adenosine hydrolysis in platelets. In serum we observed an increased of ALP activity and adenosine hydrolysis.

Conclusions: These results allow us to infer that in patients who had surgical removal of CM purinergic signaling would be preventing the growth of a new tumor since more ATP is available in the extracellular milieu.

Keywords: Cutaneous Melanoma, Purinergic System, Ectonucleotidases, Platelets

1. Introduction

The Cutaneous Melanoma (CM) is formed by malignant transformation of melanocytes, the pigment-producing cells of the skin. The melanomagenesis involves genetic and environmental factors and occurs in different parts of body by combining mutagenic and genotoxic effects on melanocytes (Bertolotto, 2013).

The rate of new cases, in most countries, doubles every 10 to 15 years and shows that the CM incidence is increasing, particularly among young people. The number of lives lost by death caused by CM is thus excessively higher than for other malignancies, becoming an important public health problem (Dimatos et al., 2009; Rastrelli et al., 2013; Patushenko, 2014).

In Brazil, the highest incidence is in the southern, which affects an average of 5.6 cases per 100.000 habitants. The reasons for the high prevalence of melanoma in this part of the country is the population composition and habits: majority of Caucasian exposed to intermittent solar radiation without photoprotection (Batistti et al., 2009; Dimatos et al., 2009; Moreno et al., 2012).

Tumor cells interact with components of the hemostatic system, including platelets (Bambace and Holmes, 2011). The interactions between platelets and cancer cells are very important, considering that blood vessels are major anatomical pathways for cancer cell dissemination (Jurasz; Alonso-Escolano; Radomski, 2004).

Platelets are involved in key steps of malignancy progression: in tumor metastasis, tumor growth and angiogenesis (Bambace; Holmes, 2011), and patients with cancer may exhibit increased platelet activation (Araújo et al., 2005). Tumor cells may activate platelets by several mechanisms and one of the most important is the release of ATP and ADP (Burnstock; Di Virgilio, 2013).

The nucleotides above mentioned are a part of a system calls Purinergic System, which is composed by enzymes and receptors: ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase , E.C. 3.6.1.5, CD39), E-5'-nucleotidase (E.C 3.1.3.5, CD73), ALP (EC 3.1.3.1) and Adenosine Deaminase (ADA) – is not an ectonucleotidases (Colgan; Eltzschig; Ecklet, 2006). ADA and ectonucleotidases are platelet membrane bound enzymes (Di Virgilio, 2012). ALP and ADA are also present in serum and plays an important role in controlling the levels of circulating ATP and adenosine (Cardoso et al., 2015), being crucial for the functions exerted by the

nucleotides in all irrigated tissues, including the skin where the melanocytes are presents (Burnstock; Knight; Greig, 2012).

E-NTPDase catalyzes ATP and ADP hydrolysis, which culminates into AMP formation. E-5'-nucleotidase is responsible for AMP degradation leading to adenosine formation and ADA converts adenosine into inosine. ALPs remove the Pi of a broad range of substrates, including nucleotides (ATP, ADP, and AMP) producing adenosine (Cardoso et al., 2015).

The ectonucleotidases and ADA play an important role in regulating the tumor environment, as they are involved in maintaining the balance between the levels of ATP, ADP, AMP and adenosine (Umansky et al, 2014). The control of levels of these molecules is important because involves a wide range of biological processes including neurotransmission, cell proliferation, differentiation and apoptosis in tissues like the skin, skeletal muscle, bone and immune system (White; Burnstock, 2006). The presence of different receptors subtypes with different nucleotide and nucleoside selectivity and affinity confers to purinergic signaling the ability to physiologic and pathophysiologic responses as neurosecretion, coagulation, smooth-muscle contraction, cell growth, apoptosis, or inflammation and host–tumor interactions (Di Virgilio, 2012).

Our research group has focused the investigations in the interrelation between purinergic system, alterations in platelet homeostasis and their potential involvement in cancer: breast cancer (Araújo, et al., 2005), lung cancer (Zanini et al., 2012), cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer (Maldonado et al., 2012) bladder tumor (Rockenbach et al., 2014). Cited works clearly demonstrated that purinergic enzymes are altered in platelets of cancer patients, although the changes do not follow a standard.

In attempt to contributes with the investigations of the link between purinergic system, platelets and cancer, mainly the potential role the hydrolysis of ATP, ADP, AMP and adenosine, the aim of this work is to analyze the ATP, ADP and AMP hydrolysis and expression of CD39 and CD73 in platelets. ALP and ADA activities was also evaluated in serum of CM and control.

2. Patients e methods

The substrates adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), 5'-monophosphate sodium salt (AMP), adenosine, bovine serum albumin, Trizma base, HEPES and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiment were of analytical grade and high purity.

2.1 Patients

For this study were selected patients with CM (n=23) and control patients (n=25) from Chapecó, SC, Brazil. Patients with CM were select after diagnosis by medical oncologist as International Classification of Disease (ICD) and surgical removal of the tumor. Were selected to the analysis only patients with Breslow thickness T3/T4 (≥ 2 mm) (Breslow, 1970).

The control patients in the study were those who had no acute or chronic active pathology or MC history, in addition to having normal blood pressure and not using any drug therapy. The patients characteristics are show in the table 1. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The Human Ethics Committee of Universidade Federal da Fronteira Sul, Brazil, approved the protocol under number 822.782. Ten milliliters of blood was obtained from each patient and used for platelet separation and biochemical analyzes.

2.2 Platelet separation

Platelet-rich plasma was prepared by the method of Pilla et al. (1996) modified by Lunkes et al. (2003). Total blood was collected with sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. After this, the platelet-rich plasma was centrifuged at 5000 rpm for 30 min and washed with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0 at least twice. The platelet pellets were suspended in HEPES buffer and protein was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL.

2.3 Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. This assay is based on the binding of the dye Coomassie Blue

G-250 to protein, and this binding is accompanied by measuring the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

2.4 E-NTPDase and E-5'-nucleotidase assays

Twenty microliters of the platelet-rich plasma preparation (0.4–0.6 mg/mL protein) was added to the reaction mixture of E-NTPDase or E-5'-nucleotidase and preincubated for 10 min at 37°C, to a final volume of 200 µL. E-NTPDase activity was determined by the method of Lunkes et al. (2003), in a reaction medium containing 5.0 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 50 mM glucose, and 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1.0 mM. E-5'-nucleotidase was determined by the method of Heymann et al. (1984) in a reaction medium containing 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4. E-NTPDase and E-5'-nucleotidase reactions were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. The inorganic phosphate (Pi) released by ATP, ADP and AMP hydrolysis was measured by the method of Chan et al. (1986) using KH₂PO₄ as standard. Controls were prepared to correct for nonenzymatic hydrolysis and all samples were run in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.5 Adenosine deaminase (ADA) determination

ADA activity from platelets and serum was determined according to Giusti and Galanti (1984) based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50 µL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. Afterwards the reaction was stopped by adding a solution of 106.2 mM phenol and 167.8 mM sodium nitroprussiate and a hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was measure at 620 nm and the results were express in units per liter (U/l).

2.6 Flow cytometry analysis for CD39 and CD73

The enzymes E-NTPDase and E-5'-nucleotidase expression was performed in EDTA whole blood by flow cytometry using monoclonal antibodies anti-CD61 (FITC), anti-CD39 (FITC) and anti-CD73 (PE) for marking platelet, E-NTPDase and E-5'-nucleotidase, respectively. 100µL of whole blood were incubated with 2 ml of lysis solution for 15 minutes in the dark and then centrifuged 1000 rpm for 5 minutes. The cells were incubated with specific antibodies for 25 minutes. After, twice centrifugation 1000 rpm for 5 minutes and discarding the supernatant by adding 1 ml of PBS. For fixing, 250µl of BD Citofix® was added until analysis. The equipment used was BD Accuri C6.

2.7 Alkaline Phosphatase activity

ALP activity was performed according to Labtest Kit. The ALP in serum hydrolyzes monophosphate-releasing thymolphthalein, which is colored blue in an alkaline medium. The color formed is directly proportional to enzyme activity and measured at 590 nm. The final reaction product is composed of a mixture of blue color and the color of the substrate itself.

2.8 Statistical analysis

The data obtained were analyzed statistically by T Student test. $p < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all analyses used. Variables and other data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results

The clinical characteristics of the group studied are shown in table 1: the average age was 48 years old in the CM group and 47 years old in the control group. The percentage of affected women was higher than men: 65%. The Superficial Spreading Melanoma (SSM) has had the greater incidence in the study group ($n = 16$) while that the Acral Lentiginous Melanoma (ALM) subtype was not present. Nodular Melanoma (NM) and Lentigo Malignant Melanoma (LMM) had a low incidence in this group (5 and 2 participants respectively). The majority ($n = 20$) had the surgical removal of the CM between 2013 - 2014 and the mostly affected body

places was: lower extremities (n = 9), upper extremities (n = 6), trunk (n = 5) and head / neck (n = 3).

In relation to a risk factor for development of CM, the sun exposure was higher in CM group (30%) than control group (24%) and both groups had elevated percentage Fitzpatrick Phototype I and II (94 and 96%), characteristic of the studied area.

Figure 1 and 2 shows the hydrolysis of ATP, ADP, AMP and adenosine in platelets of MC and control groups. As can be observed, ATP, ADP and AMP hydrolysis were significantly decreased in CM patients when compared to the control group ($p < 0.05$), indicating lower E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities (Fig. 1). Related to ADA, it was observed an increase in this enzyme activity in CM patients when compared to the control group, both in platelets and in serum (Fig. 2). Moreover, there was an increase in ALP activity in serum of CM group in relation to control group ($p < 0.05$) (Fig. 3). Finally, we did not observe difference in the expression of CD39 and CD73 enzymes between CM and control group (Fig. 4) ($p < 0.05$).

4. Discussion

The incidence of CM is rising faster than any other solid tumor (Eggermont; Spatz; Robert, 2014). The prevalence of this disease is higher in women than in men and is increasing in younger people (around 50 years old) (Moreno et al., 2011). In our study there are higher percentage of women affected (65%) and the average age was 48 years old (see table 1). The data found in our study corroborates with the existent data, reinforcing that CM affects more women than men and the mean age of affected people is decreasing.

SSM is the principal type of melanoma in caucasians while ALM is more common on Black and Japanese people (Bandarchi et al., 2010). This data justify our population studied because the residents of western Santa Catarina has a higher risk of CM, mainly SSM, since it is an area colonized primarily by Caucasians (Moreno et al., 2012). In same study, Moreno et al. (2012) show that 92.7% of patients with CM were skin types I and II similar to our results where 96% had this same fototype.

A malignant tissue, produces directly or indirectly a number of substances potentially responsible for the activation of the coagulation system (Olas; Wachowicz; Mielicki, 2001). A recent study showed that potentially deleterious changes induced by the melanoma remain in the microenvironment post-surgery, mainly in tumor Breslow thickness T3/T4 (Bernardes et al., 2015), which is the object of our study. Since the enzymes of purinergic system are present in the platelets and serum regulates the circulant nucleotide levels, and this capacity can influence several processes including inflammation and cancer control (Di Virgillo, 2012), we hypothesized that this system can be altered in tumor Breslow thickness T3/T4.

Thus, our study was designed to evaluate the hydrolysis of adenine nucleotides and nucleoside in platelets and serum from patients with CM, as well as the expression of two enzymes responsible for nucleotides breakdown: CD39 and CD73.

The results obtained demonstrated that nucleotides and nucleoside hydrolysis are altered in patients with CM when compared with control group in platelets and in serum. Several studies including those from our laboratory have demonstrated that changes in nucleotides and nucleoside hydrolysis play an important role in biological processes and pathologies (Maldonado et al., 2008; Maldonado et al., 2010; Bagatini et al., 2011; Zanini et al., 2012). This is the first study showing the alterations in purinergic system enzymes as well as the nucleotides breakdown related to CM.

In platelets, our results showed a reduced ATP hydrolysis in CM patients when compared with control group (Fig. 1). These results suggest that more ATP is available on the extracellular environment and can acts on type 2 purinergic (P2) receptors in both platelets and vicinity cells (Feng et al., 2011).

The ATP extracellular released by dying tumor cells accumulated in high concentrations not only act as danger signal emitted by dying tumor cells and is released by immune cells in this way it is considered important for the efficient immune responses (Feng et al., 2011). ATP can also be released from the cytosol of necrotic cells, which are always present in the center of fast-growing tumors such in melanomas (Jackson et al., 2007; Feng et al., 2011). According with our results Feng et al. (2011) also showed that extracellular ATP released by dying tumor cells accumulates in high concentrations and not only act as danger signals in the immune system, but also can directly kill adjacent tumor cells via link P2X7 receptors. Another study, using a genetically modified melanoma cell line, showed that the ATP displays

anti-tumor effect that can be amplified by inhibition of the CD39 activity (Yegutkin et al., 2011).

Moreover, in our study, was found ATP, ADP and AMP hydrolysis significantly decreased (Fig. 1). The explanation to the decrease in ADP and AMP hydrolysis is the reduced activity in the first enzyme of the cascade, the E-NTPDase, which has as consequence the diminution of ADP as well as AMP production and breakdown. In uterine cervical neoplasia the ATP, ADP and AMP hydrolysis was decreased in patients treated with conization surgery or radiotherapy. In this case, E-NTPDase acts more as a protection against platelet aggregation and E-5'-Nucleotidase is in reduction adenosine formation in the sense to control tumor cell development (Maldonado et al., 2010).

The E-5'-Nucleotidase is the rate-limiting step of adenosine formation from released adenine nucleotides. Besides, it is also feed-forward inhibition by ATP and ADP, which bind to the catalytic site of the enzyme reducing adenosine formation from AMP (Cardoso et al., 2015). Interestingly, our results show that adenosine hydrolysis in platelets and serum was increased when compared to control group, although AMP hydrolysis was decreased, that suggests an increase in ADA activity (Fig.2). The increase of ADA activity can respond to the recovery paths of purines and pyrimidines in cancerous cells and tissues, as a compensatory mechanism against accumulation of toxic substrates or substrate supply coming from other pathways, for example by ALP (Donofrio et al., 1978; Hersfield et al., 1980). This should be highlighted, since can be one of the mechanisms used to protect the organism against cancer progression (Hersfield et al., 1980).

The ALP enzyme degrades nucleoside 5'-tri-, -di-, and -monophosphates and release inorganic phosphate from a variety of organic compounds, including proteins (Zimmermann, 2001; Cardoso et al., 2015). It is anchor to the plasma membrane and its soluble forms occur in serum (Zimmermann, 2001). One single enzyme could thus catalyze the entire hydrolysis chain from ATP to the respective nucleoside - adenosine (Zimmermann, 2001). Trying to explain why ADA activity is augmented in CM group (even with the decrease in AMP breakdown, which apparently could culminates in the reduction in adenosine production), we analyzed the activity of ALP (Fig.3). We observed a significant increase in its activity, which may be the source of the adenosine substrate for the ADA activity. This increase of ADA activity, could lead a decrease in adenosine levels, which is highly desirable, once that adenosine

presents tumor-promoting functions, by stimulation angiogenesis and cytoprotection (Di Virgilio, 2012).

No difference was observed in the expression of CD39 and CD73 (Fig. 4). These observations allow us to infer that these enzymes can be inhibited, once that was observed a decreased in enzyme activities and no difference in its expression (Yegutkin et al., 2011).

Thus, in our study, we found a decrease in extracellular ATP degradation rate, increased ADA activity in both platelets and serum, being beneficial to patients with CM due anti-neoplastic activity by increased ATP extracellular and decreased adenosine. It is plausible to suggest that changes in activities that metabolize adenine nucleotides on the surface of platelets may be involved in platelet activation mainly by the adenine nucleotides and nucleoside. Thus could be suggest that in patients who had surgical removal of CM, purinergic signaling would be acting preventing the growth of a new tumor because ATP is not being degraded by platelets and adenosine was degraded, may signal lymphocytes for an immune response. Our results allow us to think about open new avenues for investigation in cancer treatment especially CM, that is a very aggressive cancer and it has a low life prospect in some cases.

We declare that we have no conflict of interest

Table 1: Clinical characteristics of the control group and Cutaneous Melanoma patients.

<i>Variable</i>	<i>Control (n=25)</i>	<i>Cutaneous Melanoma (n=23)</i>
Age	47±13	48±12.5
Men (%)	70	35
Women (%)	30	65
Tumor location		
Lower extremities	-	9
Upper extremities	-	6
Trunk	-	5
Head/neck	-	3
Subtypes		
Superficial Spreading Melanoma	-	16
Nodular Melanoma	-	5
Lentigo Maligno Melanoma	-	2
Acral Lentiginous Melanoma	-	-
Time after surgery		
< 1 year	-	3
1 – 2 years	-	20
Sun exposure (%)	24	30
Fitzpatrick skin classification:		
I / II (%)	94	96
III / IV / V (%)	6	4

Figure 1:

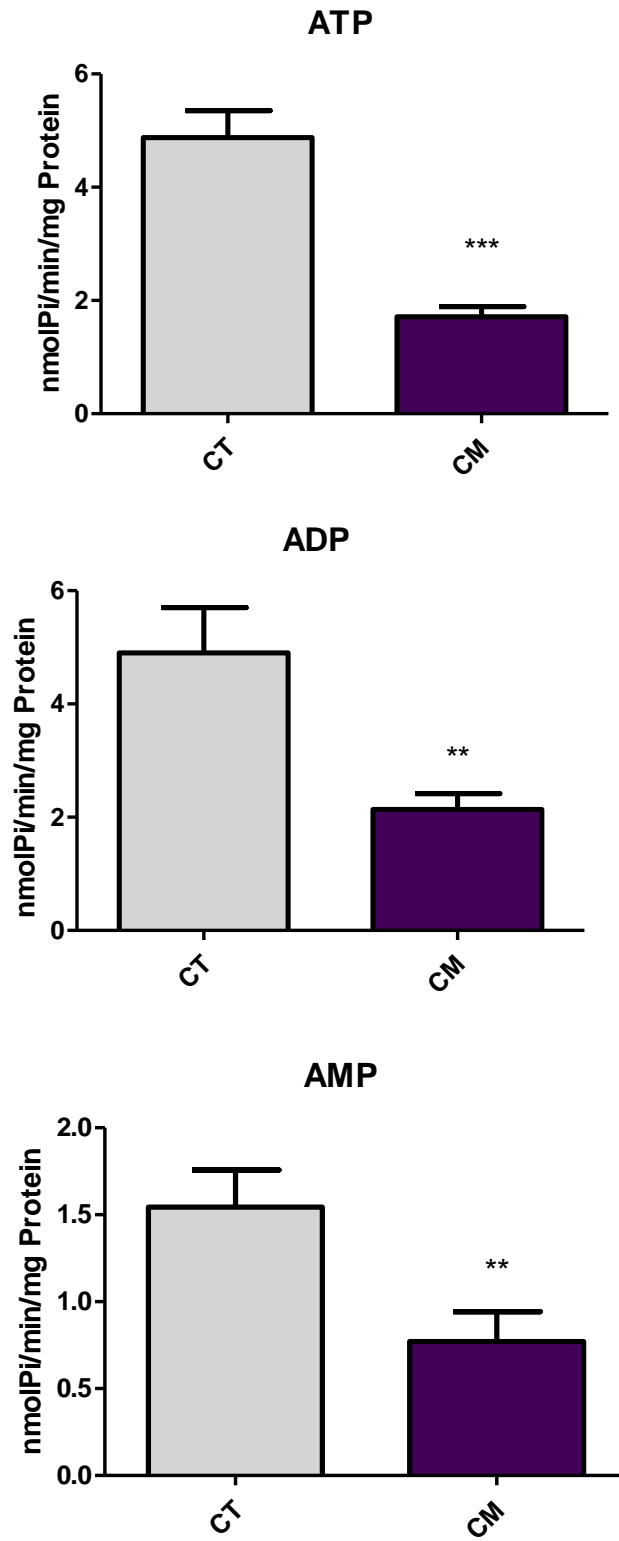


Figure 2:

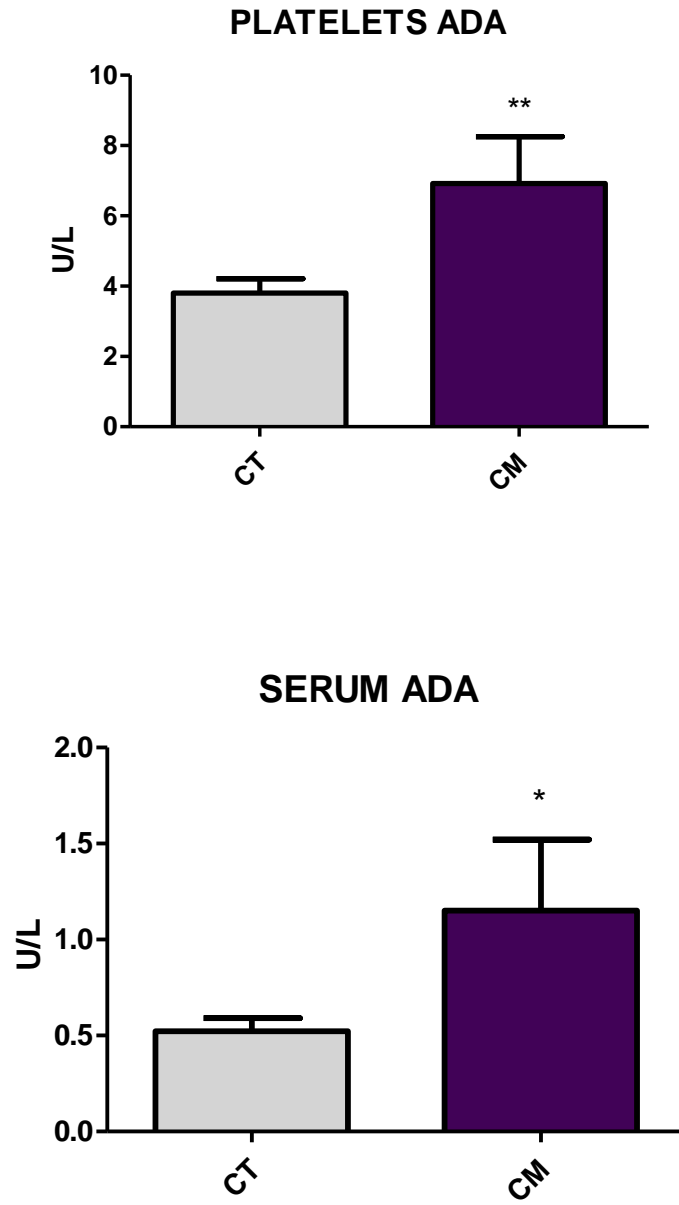


Figure 3:

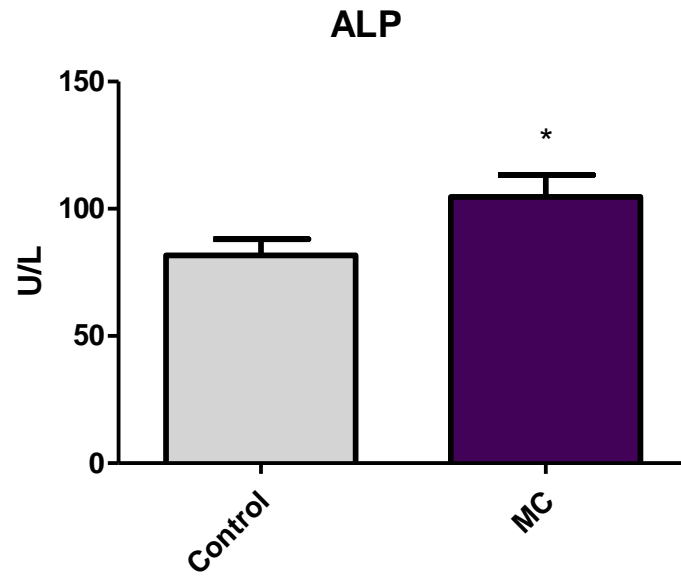


Figure 4:

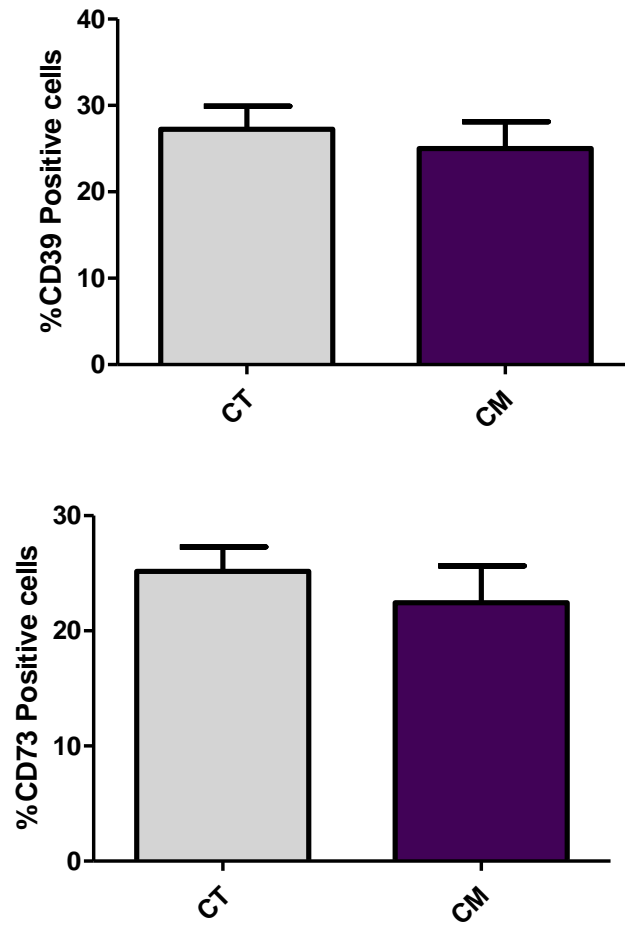


Fig. 1: NTPDase (ATP and ADP) and 5'-nucleotidase (AMP) activities in platelets of CM patients and control group. Bars represent means \pm SEM. ** *** Represents statistical difference from the control group ($p < 0.05$).

Fig. 2: ADA activity in platelets and serum of CM patients. Bars represent means \pm SEM. * ** Represents statistical difference from the control group ($p < 0.05$).

Fig. 3: ALP activity in serum of CM patients and control group. Bars represent means \pm SEM. * Represents statistical difference from the control group ($p < 0.05$).

Fig. 4: Percentage of CD39 and CD73 positive cells from CM patients and control group. Bars represent means \pm SEM.

REFERENCES

- Araújo, M.C. et al. Enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients (2005). *Biochim Biophys Acta*. 1740(3):421-6. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.001
- Bambace, N. M; Holmes, C. E. The platelet contribution to cancer progression (2011). *J Thromb Haemost*. Feb;9(2):237-49. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04131.x.
- Bandarchi B.; Ma L.; Navab R.; Seth A.; Rasty G.; From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma (2010). *Dermatol Res Pract.*; 2010: 5 837-48. doi: 10.1155/2010/583748
- Battisti, R.; Holthausen Nunes, D.; Weber, A. Schweitzer, L.; C. Sgrott. I. Avaliação do perfil epidemiológico e da mortalidade dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo primário no município de Florianópolis - SC, Brasil (2009). *An. Bras. Dermatol*. 84 (4): 335-342. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962009000400003>
- Bernardes S.S.; Souza-Neto F.P.; Ramalho L.N.; Derossi D.R.; Guarnier F.A.; Da Silva C.F.; Melo G.P.; Simão A.N.; Cecchini R.; Cecchini A.L. (2015) Systemic oxidative profile after tumor removal and the tumor microenvironment in melanoma patients. *Cancer Lett*. Jun 1; 361(2): 226-32. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.007.
- Bertolotto, Corine. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options (2013). *Scientifica*, 2013: 22 . doi:10.1155/2013/635203
- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding (1976). *Anal. Biochem.*, 72, 248
- Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma (1970). *Ann Surg.*;172:902-8.
- Burnstock, G.; Di Virgilio, F. Purinergic Signalling and Cancer (2013). *Purinergic Signal*. Dec;9(4):491-540. doi: 10.1007/s11302-013-9372-5
- Cardoso A.M.; Schetinger M.R.; Correia-de-Sá P.; Sévigny J. Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions (2015). *Auton Neurosci*. doi: 10.1016/j.autneu.2015.04.014.
- Colgan Sp, Eltzhig Hk, Eckle T, et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73) (2006). *Purinergic Signal*. Jun;2(2):351-60. doi: 10.1007/s11302-005-5302-5.
- Di Virgilio, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer (2012). *Cancer Res*. Nov 1;72(21):5441-7. doi: 10.1158/0008-5472

Dimatos, D.C. et al. Melanoma Cutâneo no Brasil (2009). *Arq Catarinenses de Medicina*, Florianópolis, v. 38, p. 14 – 19.

Donofrio J, Coleman MS, Huton JJ, et al (1978). Overproduction of adenosine deoxynucleosides and deoxynucleosine in adenosine deaminase deficiency with sever combined immunodeficiency disease. *J Clin Invest*. Oct; 62(4): 884–887. doi: 10.1172/JCI109201

Eggermont, A.M.M.; Spatz, A.; Robert, C. Cutaneous melanoma (2014). *The Lancet*, 383: 816-825. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60802-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60802-8)

Feng L, Sun X, Csizmadia E, Han L, Bian S, Murakami T, WangX, Robson SC, Wu Y (2011). Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. *Neoplasia* 13:206–216. doi: 10.1593/neo.101332

Giusti, G. et al. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor (1984). *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim Verlag Chemie, p. 315–323.

Hersfield MS, Kredich NM (1980). Resistance of adenosine kinase deficient human lymphoblastoid cell line to effects of deoxynucleosine on growth. S-adenosylhomocystein hydrolase inactivation and dATP accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul; 77(7): 4292–4296.

Heyman D., Reddington M., Kreutzberg G.W.. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain (1984), *J Neurochem*. Oct;43(4):971-8. doi: 10.1111/j.1471-4159.1984.tb12832.x

Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enjyoji K, Cszimadia E, Sundberg C, and Robson SC (2007). Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in CD39/ENTPD1-null mice. *Am J Pathol*. Oct; 171(4): 1395–1404. doi: 10.2353/ajpath.2007.070190

Jurasz, P.; Alonso-Escolano, A.; Radomski, M. W. Platelet–cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation (2004). *Br J Pharmacol*. Dec; 143(7): 819–826. doi: 10.1038/sj.bjp.0706013

Lunkes, G.I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies (2003). *Thromb Res*. Feb 15;109(4):189-94. doi: 10.1016/S0049-3848(03)00178-6

Maldonado, P. A. et al. Ectonucleotide Pyrophosphatase /Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia (2008). *Clin Biochem*. Apr;41(6):400-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.

Maldonado P.A.; Negrini L.A.; Ethur J.S.; Oliveira L.; Corrêa M.C.; Becker L.V.; Zanin R.F.; Morsch V.M.; Schetinger M.R. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy (2010). *Biomed Pharmacother*. 64(7):499-504. doi: 10.1016/j.biopha.2010.02.007.

Maldonado, P.A. et al. Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer (2012). *Biomed Pharmacother.* Feb;66(1):6-11. doi: 10.1016/j.biopha.2011.09.007

Bagatini M.D.; Martins C.C.; Gasparetto D et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease (2011). *Clin Chim Acta.* 412(1-2):159-64. doi: 10.1016/j.cca.2010.09.033

Moreno, M.; Batista, F.R.B.; Bonetti, T.C (2012). Sobrevida de Pacientes com Melanoma Cutâneo na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*; 58(4): 647-653.

Olas, B.; Wachowicza, B.; Mielicki, Wojciech P. Cancer procoagulant and blood platelet activation (2001). *Cancer Lett.* 28;169(2):165-71. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00545-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00545-6)

Pastushenko, I (2014). Mechanisms of tumour vascularisation in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. *Br J Dermatol.* Aug;171(2):220-33. doi:10.1111/bjd.12973.

Pilla, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets (1996). *Platelets.* 7(4):225-30. doi: 10.3109/09537109609023582.

Rastrelli, M. et al. Melanoma M (Zero): Diagnosis and Therapy (2013). *ISRN Dermatol.* 2013 Apr 11:616170. doi: 10.1155/2013/616170.

Rockenbach, L. et al. NTPDase3 and ecto-5' nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression (2014). *Purinergic Signal.* 2014 Sep;10(3):421-30. doi: 10.1007/s11302-014-9405-8.

Siegel, Rebecca MPH et al. *Cancer Statistics, 2014. CA CANCER J CLIN* 2014;64:9–29 VOLUME 64 _ NUMBER 1 _ JANUARY/FEBRUARY 2014

Umansky V, Shevchenko I, Bazhin AV, Utikal J. (2014). Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* Oct;63(10):1073-80. doi: 10.1007/s00262-014-1553-8.

White, N.; Burnstock, G (2006). P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* Apr;27(4):211-7. doi:10.1016/j.tips.2006.02.004

Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemela J, Laurila JP, Elima K, Jalkanen S, Salmi M (2011) Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol.* May;41(5):1231-41. doi: 10.1002/eji.201041292.

Zanini, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets (2012). *Biomed Pharmacother.* Feb;66(1):40-5. doi: 10.1016/j.biopha.2011.09.003.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature (2001). *Drug Dev Res.* 52: 44–56. doi: 10.1002/ddr.1097

4. CONCLUSÃO

- A diminuição da atividade da enzima E-NTPDase e E-5'-Nucleotidase em plaquetas de pacientes que fizeram a remoção cirúrgica do MC, sugere uma maior disponibilidade de ATP no ambiente extracelular, considerando o efeito protetor dessa molécula. Já o aumento na atividade da ADA em plaquetas indica uma maior degradação da adenosina, considerando que a mesma é uma molécula pró-tumoral.
- A não alteração na expressão das enzimas E-NTPDase e E-5'-Nucleotidase sinaliza que as mesmas estão sendo produzidas, porém podem estar inibidas pelo efeito compensatório do organismo com o objetivo de manter os níveis de substratos, principalmente do ATP.
- O aumento na atividade da enzima FAL e ADA em soro é possivelmente a via alternativa de produção e degradação da adenosina, uma vez que a mesma não é benéfica para os pacientes com MC. Sendo assim houve uma alteração na atividade nas enzimas que degradam os nucleotídeos e o nucleosídeo adenina em pacientes com MC pós remoção cirúrgica do tumor e essas moléculas podem estar sendo metabolizadas diferentemente nesses pacientes como mecanismo de equilibrar os efeitos maléficos do tumor.

REFERÊNCIAS

AGHAEI, M. et al. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: The assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. **Clinical Biochemistry**, vol. 38, n. 10, p. 887 – 891, out. 2005.

ALMEIDA, Vera Lúcia, et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, vol. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ARAÚJO, M.C., et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol 1740, n. 3, p. 421–426, jun. 2005.

BAMBACE, N. M; HOLMES, C. E. The platelet contribution to cancer progression. **J Thromb Haemost.** vol. 9, n. 2, p. 237-49. Fev, 2011

BANDARCHI, Bizhan, et al. From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. **Dermatology Research and Practice.** vol. 2010, p. 8. Jul, 2010

BATTISTI, R. et al. I. Avaliação do perfil epidemiológico e da mortalidade dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo primário no município de Florianópolis - SC, Brasil). **An. Bras. Dermatol.** vol.84, n. 4, p. 335-342, 2009

BERTOLOTTO, C. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options. **Scientifica.** França, vol. 2013, p. 22, nov. 2013.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends Pharmacol.** vol. 27, n. 3, p. 166–176, 2006

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

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

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors and pain. **Curr. Pharm.** vol. 15, p. 1717–1735, 2009

CARDOSO A.M.; SCHETINGER M.R.; CORREIA-DE-SÁ P.; SÉVIGNY J. Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. **Auton Neurosci**. 2015

DIMATOS, D.C. et al. Melanoma Cutâneo no Brasil. **Arq Catarinenses de Medicina**, Florianópolis, v. 38, p. 14 – 19, 2009.

DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. **Cancer Res**, vol. 72, n. 21, nov. 2012.

EGGERMONT, A.M.M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, vol. 383, p. 816-825, Março, 2014.

FACINA, Taís. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Rio de Janeiro: **INCA**, 2014. p. 124

FENG, L. et al. Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. **Neoplasia**, vol. 13, n. 13. p. 206–216. Mar, 2011.

FITZPATRICK, T.B.; HAYNES, H.A. Lesões cutâneas de significado clínico geral. **Guanabara Koogan**. 10 ed. Rio de Janeiro, p. 281 -290, 1984

GANDINI, Sara et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III – family history, actinic damage and phenotypic factors. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2040 – 2059, 2005

GARBE, C. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. **European Journal of Cancer**, vol. 48, n.15, 2375 – 2390, out. 2012.

GODINGA, James W; GROBBENB, Bert; SLEGER, Herman. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase Family. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1638, p. 1 – 19, 2003.

JURASZ, P.; ALONSO-ESCOLANO, A.; RADOMSKI, M. W. Platelet–cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. **Br J Pharmacol. Dec**; vol. 143, n. 7, p. 819–826, 2004

LAGES, R.B. et al. Linfonodo sentinela em melanoma: experiência inicial de um centro do nordeste brasileiro. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, vol. 86, n. 2, p. 379-382, mar/abr, 2011.

LI, Rong et al. Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. **BMC Cancer**, vol. 14, n. 167, 2014

LONSDORF, Anke S., et al. Engagement of α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) with α 3 Integrin Mediates Interaction of Melanoma Cells with Platelets: A Connection To Hematogenous Metastasis. **The Journal Of Biological Chemistry**. vol. 287, n. 3, p. 2168–2178, Jan, 2012

MALDONADO, P. A. et al. Ectonucleotide Pyrophosphatase /Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical Biochemistry**, vol. 41, n. 6, p.400–406, abr. 2008.

MALDONADO, P.A. et al. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. **Biomed Pharmacother**. vol. 64, n. 7, p. 499-504, set. 2010.

MALDONADO, P.A. et al. Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer. **Biomed Pharmacotherapy**, vol. 66, n. 1, p. 6–11, fev. 2012.

MARTINS-COSTA, G.M. et al. Melanoma cutâneo primário: confirmações e novidades. **AMRIGS**, Porto Alegre, 57 ed. n. 3. p. 208-212, jul.-set. 2013

MERVIC, Liljana. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma. **Acta Dermatovenerologica**. vol. 21, p. 27-31, 2012

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 357, de 8 de abril de 2013: **Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo**. Disponível em: << http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html >>. Brasília. 2013.

MITCHELL, David. Revising the photochemistry of solar UVA in human skin. **Proceedings of National Academy of Sciences**. vol. 103, n. 37, p. 13567 – 13568, 2006

MORENO, M. et al. Epidemiological profile of patients with cutaneous melanoma in a region of southern Brazil. **J Skin Cancer**, v. 2012, p. 1-8, jan. 2012.

OLAS, B.; WACHOWICZA, B.; MIELICKI, Wojciech P. Cancer procoagulant and blood platelet activation. **Cancer Lett.** vol. 28, n. 169, p. 165-71, 2001

OLIVEIRA FILHO R.S. et al. Melanoma cutâneo localizado e linfonodo sentinela. Sao Paulo: **Lemar**; 2003. 210 p.

OLIVEIRA, Ingrid et al. Platelets: Traditional and nontraditional roles in hemostasis, inflammation and cancer. **ABCS Health Sci.** vol. 38, n. 3, p. 153-161, 2013

PASTUSHENKO, I. Mechanisms of tumour vascularisation in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. **British Journal of Dermatology**, mar 2014.

RABENHORST, Silvia H; BURINI, Roberto C; SCHMITT, Fernando C. L. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Rev. bras. cancerol**, vol. 40, n. 3, p. 141-7, jul.-set. 1994.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, USA, vol. 50, n. 3, set. 1998.

RASTRELLI, M. et al. Melanoma M (Zero): Diagnosis and Therapy. **ISRN Dermatology**, vol. 2013, p. 1 -10, mar. 2013.

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

RONG et al. Radiotherapy treatment for nonmelanoma skin cancer. **Expert Rev. Anticancer Ther.** Early online, p. 1–12. 2015.

RING, Sabine; ENK, Alexander H; MAHNKE, Karsten. ATP Activates Regulatory T Cells In Vivo during Contact Hypersensitivity Reactions. **Journal Immunol.** vol. 184, p. 3408-3416. Mar. 2010.

RUDDON, Raymond W. Câncer biology. 4 ed. **Oxford University Press**, Inc, 2007.

SAPIENZA, M. T., et al. Pesquisa do linfonodo sentinela em pacientes com melanoma: experiência com fitato marcado Tecnécio-^{99m} e revisão da literatura. **Rev. Bras. Dermatologia**, Rio de Janeiro, vol. 79, n. 2, p. 181 – 191, mar/abr, 2014.

SIEGEL, Rebecca M.P.H. et al. Cancer Statistics, 2014. **Ca Cancer J Clin**, vol. 64, n. 1, p.9–29, jan/fev, 2014.

SHABBIR, M.; BURNSTOCK, G. Purinergic receptor-mediated effects of adenosine 5-triphosphate in urological malignant diseases. **Inter. Journal of Urology**, vol.16, n. 2, p. 143–150, fev. 2009.

SPYCHALA J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacol Ther**, vol. 87, n. 2-3, p.161–73, ago/set. 2000.

TSAO, H. et al. Melanoma: from mutations to medicine. **Genes & Development**, vol. 26, n. 11, p.1131–1155, jun. 2012.

VALKO M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. vol. 160, n. 1, 10, p. 1–40, Março, 2006

WAINSTEIN, A. J. A.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Rev Col Bras Cir**, v. 31, n. 3, 2004.

WEBER, A. L. Avaliação histopatológica de 496 laudos de melanoma diagnosticados no município de Florianópolis, SC, Brasil. Florianópolis, 2006. 45 p.

WHITE, N. et al. P2Y purinergic receptors regulate the growth of human melanomas. **Cancer Lett.**, vol. 224, n. 1, p. 81–91, jun. 2005.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**. vol.27, n. 4, p. 211-7, abr. 2006.

YEGUTKIN, G.G. et al. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. **Eur J Immunol**. vol. 41, n. 5, p. 1231-41. Mai, 2011

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomed Pharmacother.** vol. 66, n. 1, p. 40-5. Fev, 2012.

ZIMMERMANN H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Develop Res**, vol. 52, n. 1-2, p. 44-56, maio. 2001

APÊNDICES

Apêndice A

FICHA DE COLETA: PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO

Nome: _____

RG: _____ CPF: _____

Data de nascimento: __/__/__ Telefone: _____

Sexo: () F () M

Endereço: _____

Há quanto tempo foi diagnosticado o melanoma? _____

Qual o tipo e localização do melanoma: _____

Toma medicamentos? Sim () Não ()

Se sim, quais são? _____

Já fez transfusão de sangue? Sim () Não ()

Você fuma? Sim () Não ()

Ingere bebidas alcoólicas frequentemente? Sim () Não ()

Tem ou teve alguma das doenças abaixo?

- Problemas cardíacos? Sim () Não ()

- Pressão alta? Sim () Não ()

- Anemia? Sim () Não ()

- Hepatite? Sim () Não ()

- Diabetes? Sim () Não ()

- Depressão? Sim () Não ()

- HIV? Sim () Não ()

- Outras? _____

Tem exposição solar freqüente? Sim () Não ()

Cor da pele: () Branca () Morena () Negra

Profissão: _____

Data coleta: __/__/__

Apêndice B

FICHA DE COLETA: PACIENTES SAUDÁVEIS - CONTROLES

Nome: _____

RG: _____ CPF: _____

Data de nascimento: __/__/__

Sexo: () F () M

Telefone: _____

Endereço: _____

Toma medicamentos? Sim () Não ()

Se sim, quais são? _____

Já fez transfusão de sangue? Sim () Não ()

Você fuma? Sim () Não ()

Ingere bebidas alcoólicas frequentemente? Sim () Não ()

Tem ou teve alguma das doenças abaixo?

- Problemas cardíacos? Sim () Não ()

- Pressão alta? Sim () Não ()

- Anemia? Sim () Não ()

- Hepatite? Sim () Não ()

- Diabetes? Sim () Não ()

- Depressão? Sim () Não ()

- HIV? Sim () Não ()

- Outras? _____

Tem exposição solar freqüente? Sim () Não ()

Cor da pele: () Branca () Morena () Negra

Profissão: _____

Data coleta: __/__/__

Apêndice C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Curso de Enfermagem da Universidade Federal da Fronteira Sul, está desenvolvendo um projeto de pesquisa intitulado: Avaliação de Enzimas que Degradam Nucleotídeos e Nucleosídeos de Adenina em Pacientes com Melanoma Cutâneo, através da mestrandia Aline Mânica - Universidade Federal da Fronteira Sul - Rua General Osório, 413D, CEP: 89802-210. Bairro Jardim Itália, Chapecó SC, que tem por objetivo estudar dosagens bioquímicas em algumas enzimas de pacientes da cidade de Chapecó – SC, que tiveram diagnóstico de melanoma cutâneo. O projeto de pesquisa justifica-se pelos elevados fatores de risco presentes, visto que os hábitos de vida da população, a exposição solar intermitente sem a devida proteção e as características étnicas, são também desfavoráveis: uma maioria de habitantes de pele clara expostos a radiação solar vários meses por ano.

Os voluntários participantes da pesquisa permitirão uma coleta de sangue. Todo o material utilizado para a coleta será descartado adequadamente. Em caso de acidente de coleta, os pacientes poderão desenvolver leve inflamação local ou pequena/discreta hemorragia, neste caso serão atendidos e receberão os cuidados necessários no local. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos.

A participação neste estudo é livre e voluntária, sendo que não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o participante. No entanto, a participação no estudo garante a realização de exames laboratoriais, como forma de devolutiva a participação no projeto de pesquisa como: hemograma, perfil lipídico e glicídico e parâmetros inflamatórios. Esses exames serão realizados e entregues gratuitamente para os voluntários com orientações em caso de alguma alteração patológica, sendo estes encaminhados para atendimento especializado. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados de saúde aos pacientes. A qualquer momento durante a realização da pesquisa e após finalização da mesma os participantes poderão esclarecer qualquer dúvida através dos contatos disponibilizados abaixo.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que estou de acordo em participar deste projeto de pesquisa, livre de qualquer constrangimento, pois fui informado de forma clara e detalhada dos objetivos e dos procedimentos que serão realizados. Fui igualmente informado da garantia de receber respostas a qualquer dúvida que ainda puder ter sobre assuntos relacionados com a pesquisa por meio do contato com o pesquisador e/ou E-mail, (vide endereço abaixo), e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

Os dados coletados ficarão sob-responsabilidade do pesquisador e os mesmos serão utilizados apenas para fins científicos, garantindo o anonimato dos sujeitos durante todas as fases da pesquisa e mesmo após finalização da mesma.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu _____ estou de acordo em participar nesta pesquisa, rubricando a primeira página e assinando a segunda página deste consentimento. Uma via ficará de posse do pesquisador e a outra com o participante.

Chapecó/ SC, ____de____2014.

Assinatura

Aline Mânica/Pesquisadora/(49) 9166-1637 ou (55) 9990 – 2460

Rua Marechal J. Bormann, 61 E. Centro, Chapecó SC CEP: 89.802-200
Universidade Federal da Fronteira Sul. Rua General Osório, 413D, CEP: 89802-210. Bairro Jardim Itália, Chapecó SC

Margarete Dulce Bagatini/Coordenadora (49) 9911-4126
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul
Avenida General Osório, 413-D, Jardim Itália, Ed. Mantelli, 3º andar.
CEP: 89.802-210 - Chapecó-SC.
Fone: (49) 2049-1478
E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br

ANEXOS

Anexo 1: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de Enzimas que Degradam Nucleotídeos e Nucleosídeos de Adenina em Pacientes com Melanoma Cutâneo.

Pesquisador: Margarete Dulce Bagatini

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 33702814.5.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 822.782

Data da Relatoria: 19/10/2014

Apresentação do Projeto:

TRANSCRIÇÃO DO RESUMO:

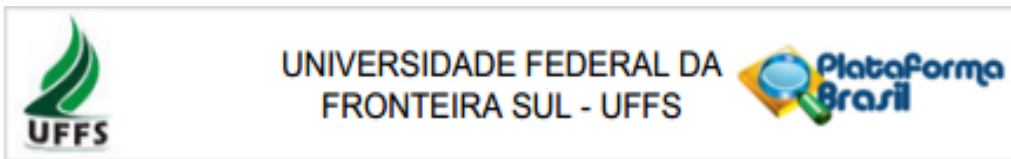
O Melanoma Cutâneo (MC) é a neoplasia maligna com maior crescimento na última década, tornando-se um problema de saúde pública. No Brasil, as maiores taxas de incidência estão na região sul, devido aos hábitos e as características da população. Vários fatores podem estar envolvidos neste tipo de câncer inclusive o sistema purinérgico. O objetivo deste estudo será avaliar as enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em plaquetas e linfócitos de pacientes com MC. Serão selecionados 60 pacientes, com diagnóstico de MC, com idade entre 30 e 60 anos e 60 indivíduos saudáveis do mesmo sexo e na mesma faixa etária. Será realizada uma coleta de sangue, através de punção venosa para determinação dos parâmetros enzimáticos e da agregação plaquetária. O estudo do MC é de fundamental importância para diminuir a mortalidade e reduzir os gastos públicos, já que a frequência de novos casos está dobrando a cada década e os índices aumentando em pessoas jovens.

Objetivo da Pesquisa:

TRANSCRIÇÃO DOS OBJETIVOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO:

Objetivo Primário:

Endereço: Avenida General Osório, 413d - Ed. Mantelli da UFFS	
Bairro: CENTRO	CEP: 89.802-265
UF: SC	Município: CHAPECO
Telefone: (49)2049-1478	E-mail: joseane@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 822.782

Avaliar os marcadores do sistema purinérgico e enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em plaquetas e linfócitos de pacientes com Melanoma Cutâneo (MC).

Objetivo Secundário:

- Analisar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-NPP, E-5'-Nucleotidase e ADA em plaquetas e linfócitos de pacientes com MC e em pacientes controles.
- Verificar a expressão das enzimas E-NTPDase e E-5'-Nucleotidase em plaquetas e linfócitos da população estudada.
- Quantificar o nível sorológico dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e do nucleosídeo adenosina em ambos os grupos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estavam adequadamente descritos no TCLE. Foi solicitado que a informação fosse escrita no campo "Riscos e Benefícios" da plataforma brasil. Atendido.

Riscos e benefícios: de acordo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora atendeu às solicitações do CEP e o trabalho apresenta elevada relevância social e científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo. Ver parecer consubstanciado do CEP número 816.552.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu às solicitações do CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua

Endereço: Avenida General Osório, 413d - Ed. Mantelli da UFFS	
Bairro: CENTRO	CEP: 89.802-265
UF: SC	Município: CHAPECO
Telefone: (49)2049-1478	E-mail: joseane@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 822.782

pesquisa. Tenha em mente a Resolução 466 de 12/12/2012 principalmente, os artigos XI.1 e XI.2 itens c) ao h) , a Normativa 001/2013 e o Capítulo III da Resolução 251/1997.

A página do CEP-UFFS apresenta alguns pontos no documento "Deveres do Pesquisador" acessível ao Link http://www.uffs.edu.br/images/proppg/Deveres_do_pesquisador_CEP.pdf

Atente:

1) No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, obedecidos os 20 dias antes da reunião do CEP de mês correspondente aos 6 meses, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra (exceto se a pesquisa estiver totalmente finalizada, pois, neste caso, deverá ser enviado o relatório final). Veja modelo na página do CEP, no item "6) Documentos a serem anexados à Plataforma Brasil" no subitem " 6.1) Obrigatórios " . A cada 6 meses novo relatório parcial deverá ser enviado até que seja enviado o relatório final.

2) Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP para que possa ser avaliada e as medidas adequadas possam ser tomadas. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto. Após um projeto ter sido aprovado, alterações devem ser solicitadas na forma de EMENDA.

3) Além do relatório semestral, a qualquer momento o CEP poderá solicitar esclarecimentos sobre a sua pesquisa – vide artigos X.1.3.b), X.3.f e XI.2.e)

4) Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final

OBS: Os relatórios deverão ser enviados utilizando-se da opção "enviar notificação", na "Plataforma Brasil".

Em caso de dúvida: (1) contate este CEP pelo telefone 20491478, das 8:00 às 12:00 e das 14:00 às 17:00

(2) contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicite ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta, (3) Contate a "central de suporte" da plataforma Brasil no canto superior direito da plataforma e cujo atendimento é online.

Boa pesquisa!

Endereço: Avenida General Csório, 413d - Ed. Mantelli da UFFS

Bairro: CENTRO

CEP: 89.802-365

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-1478

E-mail: joseane@uffs.edu.br