



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA
PURINÉRGICO E DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA COLORRETAL ESPORÁDICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JACIRA BATISTA DE OLIVEIRA

CHAPECÓ - SC

2022

JACIRA BATISTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO
E DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA COLORRETAL ESPORÁDICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Zanini
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sarah F. V. O. Maciel

CHAPECÓ-SC

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Jacira Batista de Oliveira
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA
PURINÉRGICO E DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA COLORRETAL ESPORÁDICO / Jacira Batista de
Oliveira . -- 2022.
72 f.

Orientador: Doutora Daniela Zanini
Co-orientadora: Doutora Sarah Franco Vieira de
Oliveira Maciel

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas, Chapecó, SC, 2022.

1. Câncer Colorretal; Sistema Purinérgico; Estresse
Oxidativo; Antioxidantes.. I. Zanini, Daniela, orient.
II. , Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel ,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JACIRA BATISTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO
E DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA COLORRETAL ESPORÁDICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, da
Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biomédicas, apresentado para a Banca Examinadora em 27/10/2022

Aprovada em 27 / 10 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Daniela Zanini

Prof.^a Dr.^a Daniela Zanini - UFFS
(Orientador)

Aline Mânica

Prof.^a Dr.^a Aline Mânica – UNOCHAPECÓ
(Avaliador - Membro externo)

Leonardo Barbosa Leiria

Prof.^o Dr.^o Leonardo Barbosa Leiria – UFFS
(Avaliador - Membro interno)

Chapecó, outubro de 2022.

Agradecimentos

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho, em especial minha família, minha orientadora Daniela Zanini e coorientadora Sarah F. V. O. Maciel, membros da banca, e aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da UFFS, que tive a honra de conhecer no decorrer desta trajetória, os quais sempre conduziram a buscar o conhecimento e aprendizagem, agradeço também os pacientes e/ou familiares que permitiram a realização desta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos.

Educação não transforma o mundo, educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo!

Paulo Freire

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma doença complexa que está associada ao crescimento desordenado das células do cólon e do reto, estando relacionada a condições hereditárias, ambientais e sociais. De acordo com estimativas, as taxas de incidência e mortalidade têm aumentado em todo o mundo, sendo o terceiro tumor mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres. Estudos têm revelado que alterações na sinalização purinérgica e eventos oxidativos estão atrelados ao desenvolvimento e à progressão de neoplasias, razão pela qual é extremamente relevante a avaliação desses aspectos das funções celulares em um grupo de pacientes com CCR esporádico. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das enzimas do sistema purinérgico - E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e adenosina deaminase (ADA) - em plaquetas, assim como o perfil oxidativo sérico, através da análise da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da superóxido dismutase (SOD), além dos níveis de tióis totais (T-SH), tióis não proteicos (NPSH), vitamina C (VIT C) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em um grupo de pacientes com diagnóstico de CCR do subtipo histológico adenocarcinoma. Para a análise estatística, primeiramente, os dados foram testados quanto a sua normalidade, sendo submetidos ao tratamento estatístico através da utilização do Teste *t* de Student. O nível de significância a ser utilizado é de 0,05. As amostras de plaquetas, sangue total, soro e plasma utilizadas foram coletadas por punção venosa (30 mL) de 30 pacientes com diagnóstico de CCR, anteriormente ao início do tratamento cirúrgico do tumor e/ou farmacológico, sem história familiar da doença; e de indivíduos saudáveis, do mesmo gênero e faixa etária semelhante. Foram excluídos do grupo de casos, pacientes que apresentaram qualquer outra patologia fora o CCR esporádico; e do grupo controles, os que apresentaram qualquer tipo de doença. Após o convite e o aceite na participação do estudo, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a participação na mesma. A partir das análises dos resultados, dos 30 indivíduos com diagnóstico de CCR, 63% (19 indivíduos) são homens. Em relação à atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ATP e do ADP, observou-se um aumento significativo na hidrólise dos nucleotídeos no grupo de pacientes com CCR quando comparado com o grupo controle. Sobre a atividade da E-5'-nucleotidase, também observou-se um aumento na hidrólise do AMP no grupo de pacientes com CCR quando comparado com o grupo controle. Quanto à atividade da ADA, não houve diferença significativa entre os grupos estudados pela análise dos resultados. Ainda, observou-se uma diminuição na atividade da MPO e um aumento na atividade da SOD, além de níveis séricos aumentados de NPSH, VIT C e TBARS no grupo de indivíduos doentes, quando comparados com o grupo controle saudável. Os resultados encontrados demonstram que o processo tumoral ativo promove a liberação de ATP para o meio extracelular aumentando a atividade da E-NTPDase. O excesso de ATP incrementa o processo pró-inflamatório associado ao desenvolvimento neoplásico e a sua hidrólise em ADP pela NTPDase contribui para a ampliação dos efeitos pró-coagulantes comumente observados em pacientes com doenças neoplásicas. Ainda, os pacientes com CCR tiveram um aumento na atividade da E-5'-nucleotidase e não apresentaram alteração na atividade da ADA em plaquetas, sugerindo que os níveis extracelulares de adenosina estão elevados nos mesmos, proporcionando avanço no desenvolvimento tumoral - tendo em vista as ações promotoras de crescimento tumoral e de estímulo à angiogênese características da adenosina. Em relação à MPO, mesmo que sua atividade esteja envolvida em processos inflamatórios e carcinogênicos, ela parece desempenhar um papel protetor no CCR. Sua atividade basal está relacionada à defesa imune contra tumores e a sua deficiência está ligada a um aumento na incidência de tumores do cólon e à inflamação crônica não ligada a patógenos. Ainda, o aumento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), substrato da MPO, está relacionado com a progressão do CCR. Ademais, o aumento da atividade da SOD, em pacientes com CCR, sugere a existência de um mecanismo compensatório ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no ambiente tumoral. Assim, a maior disponibilidade de substrato para essa enzima antioxidante estaria incrementando sua atividade. Além disso, o aumento dos níveis de NPSH e a manutenção dos níveis de T-SH dentro da normalidade, no grupo de pacientes, está fortemente associado ao desenvolvimento de resistência das células tumorais ao protocolo terapêutico antineoplásico. De outro modo, o aumento dos níveis de VIT C em pacientes com CCR deixa evidente a atuação preventiva desse antioxidante sobre as ações deletérias do excesso de EROs na circulação dos pacientes com câncer. Por tudo isso, os resultados aqui descritos sugerem que o CCR exerce uma importante alteração na atividade das enzimas do sistema purinérgico, assim como no perfil oxidativo dos pacientes, tornando esses parâmetros úteis na clínica médica para o monitoramento da patologia. Espera-se, assim, que esse trabalho possa contribuir para o melhor entendimento do papel do sistema purinérgico e dos biomarcadores de estresse oxidativo na fisiopatologia do CCR para que se tornem uma importante ferramenta diagnóstica e terapêutica.

Palavras-chave: Câncer Colorretal; Sistema Purinérgico; Estresse Oxidativo; Antioxidantes.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a complex disease that is related to the disordered growth of colon and rectal cells, being related to hereditary, environmental and social conditions. According to estimates, incidence and mortality rates have increased worldwide, with the third most commonly diagnosed tumor in men and the second in women. Studies have revealed that alterations in purinergic signaling and oxidative events are closely associated with the development and progression of neoplasms, which is why the assessment of these aspects of cellular functions in a group of patients with sporadic CRC is extremely relevant. The aim of the present study was to evaluate the activity of the purinergic system enzymes - E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) - in platelets, as well as the serum oxidative profile, through the analysis of superoxide dismutase activity (SOD) and levels of total thiols (T-SH), non-protein thiols (NPSH), vitamin C (VIT C) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS), in addition to myeloperoxidase (MPO) activity in a group of patients diagnosed with CRC of the histological subtype adenocarcinoma. For statistical analysis, data were first tested for normality, being subjected to statistical treatment using Student's t test. The significance level to be used is 0.05. The platelet, whole blood, serum and plasma samples used were collected by venipuncture (30 mL) from 30 patients diagnosed with CRC, prior to the beginning of surgical and/or pharmacological treatment of the tumor, with no family history of the disease; and healthy individuals of the same gender and similar age group. Patients who had any pathology other than sporadic CRC were excluded from the group of cases; and from the control group, those who had any type of disease. After the invitation and acceptance to participate in the study, the participants signed the Free and Informed Consent Term for participation in the study. From the analysis of the results, of the 30 individuals diagnosed with CRC, 63% (19 individuals) are men. Regarding the activity of E-NTPDase for the hydrolysis of ATP and ADP, a significant increase in the hydrolysis of nucleotides was observed in the group of patients with CRC when compared to the control group. Regarding E-5'-nucleotidase activity, an increase in AMP hydrolysis was also observed in the group of patients with CRC when compared to the control group. As for ADA activity, there was no significant difference between the groups studied by the analysis of the results. Furthermore, a decrease in MPO activity and an increase in SOD activity were observed, in addition to increased serum levels of NPSH, VIT C and TBARS in the group of sick individuals, when compared to the healthy control group. The results found demonstrate that the active tumor process promotes the release of ATP to the extracellular environment, increasing the activity of E-NTPDase. Excess ATP increases the pro-inflammatory process associated with neoplastic development and its hydrolysis into ADP by NTPDase contributes to the expansion of procoagulant effects commonly observed in patients with neoplastic diseases. Furthermore, patients with RCC had an increase in E-5'-nucleotidase activity and no change in ADA activity in platelets, suggesting that extracellular adenosine levels are elevated in them, providing advancement in tumor development in view of the tumor growth-promoting and angiogenesis-stimulating actions characteristic of adenosine. Regarding MPO, even though its activity is involved in inflammatory and carcinogenic processes, it seems to play a protective role in CRC. Its basal activity is related to the immune defense against tumors and its deficiency is linked to an increased incidence of colon tumors and chronic inflammation not linked to pathogens. Furthermore, the increase in hydrogen peroxide (H_2O_2), a substrate of MPO, is related to the progression of CRC. Furthermore, the increase in SOD activity in patients with CRC suggests the existence of a compensatory mechanism to the increase in the production of reactive oxygen species (ROS) in the tumor environment. Thus, the greater availability of substrate for this antioxidant enzyme would increase its activity. In addition, the increase in NPSH levels and the maintenance of T-SH levels within the normal range is strongly associated with the development of resistance of neoplastic cells to the antineoplastic therapeutic protocol. On the other hand, the increase in VIT C levels in patients with CRC makes evident the preventive action of this antioxidant on the deleterious actions of excess ROS in the circulation of cancer patients. For all these reasons, the results described here suggest that CRC exerts an important alteration in the activity of the enzymes of the purinergic system, as well as in the oxidative profile of patients, and these parameters may be useful in clinical medicine to monitor the pathology. It is hoped, therefore, that this work may contribute to a better understanding of the role of the purinergic system and the biomarkers of oxidative stress in the pathophysiology of CRC so that they become an important diagnostic and therapeutic tool.

Keywords: Colorectal Cancer; Purinergic System; Oxidative stress; Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP em plaquetas de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28) *p \leq 0.0005 32
- FIGURA 2 - Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP em plaquetas de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28) *p \leq 0.05..... 32
- FIGURA 3 - Atividade da E-5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com câncer de colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28) *p \leq 0.0005 33
- FIGURA 4 - Atividade da ADA nas plaquetas de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28)..... 33
- FIGURA 5 - Atividade da MPO no plasma de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 27) *p \leq 0.005.....34
- FIGURA 6 - Atividade da SOD no sangue total de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28) *p \leq 0.0005.....34
- FIGURA 7 - Níveis de T-SH no soro de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28).....35
- FIGURA 8 - Níveis de NPSH no soro de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28) *p \leq 0.0005.....35
- FIGURA 9 - Níveis de VIT C no plasma de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=27) *p \leq 0.005.....36
- FIGURA 10 - Níveis de TBARS no soro de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28) *p \leq 0.05..36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características gerais dos pacientes e controles.....	29
TABELA 2 - Classificação do estadiamento tumoral dos pacientes com CCR.....	30

LISTA DE SIGLAS

ADA - Adenosina deaminase

ADP - Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

Ca²⁺ Cálcio

CAT - Catalase

Caco-2 - Adenocarcinoma colorretal humano

CCR - Câncer colorretal

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CID - Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde

Cl⁻ - Ânion Cloreto

DNA - Ácido desoxirribonucleico

e5NT/CD73 - Ecto-5'-nucleotidase

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

E-NTPdase - Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FAP - Polipose Adenomatose Familiar

GLUT-1 - Transportador de Glicose 1

GSH - Glutathiona

GST - Glutathiona S-Transferase

GPx - Glutathiona peroxidase

HClO - Ácido Hipocloroso

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HRO - Hospital Regional do Oeste

IFN γ - Interferon-gama

IL - Interleucina

KRAS - Sarcoma de Rato *Kirsten*

MnSOD - Superóxido dismutase dependente de Manganês

MPO - Mieloperoxidase

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida

NOCs - Compostos N-nitrosos

NO - Óxido nítrico

NPSH - Tióis não protéicos

O₂ - Oxigênio

O₂^{•-} - Ânion superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

½ O₂: Oxigênio singlete

T-SH - Tióis totais

TxA₂ - Trombotaxano A2

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

SC - Santa Catarina

Se - Selênio

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Ácido tiobarbitúrico

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNM - Tumor, Nódulos (metástases linfonodais) Metástases a distância

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral

TP53 - Proteína de Tumor

UFFS - Universidade Federal da Federal da Fronteira Sul

VIT C -Vitamina C

VIT E - Vitamina E

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 O CÂNCER COLORRETAL.....	18
3.2 SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER COLORRETAL	20
3.3 O ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER COLORRETAL.....	23
4 MATERIAL E MÉTODO.....	25
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	25
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	26
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	26
5 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	27
5.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	27
5.2 ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	27
5.2.1 Determinação da atividade da E-NTPDase e E-5'-nucleotidase.....	27
5.2.2 Determinação da atividade da adenosina deaminase (ADA)	27
5.2.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	27
5.2.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	28
5.2.5 Determinação dos grupamentos SH totais (T-SH) e não proteicos (NPSH).....	28
5.2.6 Dosagem de vitamina C no plasma	28
5.2.7 Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro.....	28
5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	28
7 RESULTADOS	29

8 DISCUSSÃO.....	36
9 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	59
ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA SF-36.....	62
ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO EORTC QLQ-C30.....	69
ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO EORTC QLQ-C30.....	70

INTRODUÇÃO

Tanto a incidência quanto a mortalidade por câncer apresentam, mundialmente, uma tendência ao crescimento. Essa patologia é considerada a segunda principal causa de morte na população adulta na maioria dos países, estando associada ao envelhecimento, ao crescimento populacional e a fatores socioeconômicos, tornando-se assim um problema de saúde pública (BRAY et al., 2018).

Nesse cenário, o câncer colorretal (CCR) é uma doença complexa que está relacionada com o crescimento desordenado das células do cólon e do reto e, de acordo com estimativas, as taxas de incidência e mortalidade por CCR têm aumentado em todo o mundo, sendo que globalmente ele é o terceiro tumor mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres (SUNG et al., 2021). Além disso, em relação às taxas de mortalidade, os estudos apontam que o CCR é o terceiro tipo tumoral mais letal em homens e o quarto mais letal em mulheres (SUNG et al., 2021).

No Brasil, o CCR é uma das neoplasias que mais acometem a população. Seguindo a tendência mundial, o CCR é o terceiro tipo tumoral mais incidente e estima-se que para cada ano do triênio de 2020-2022, mais de vinte mil novos casos de CCR sejam diagnosticados, tanto em homens quanto em mulheres. Os valores correspondem a um risco estimado de 19,6 casos novos de CCR a cada 100 mil homens e de 19,0 novos casos para cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2019).

Dentre os subtipos histológicos de CCR relacionados na literatura, os adenocarcinomas - descritos como tumores malignos que derivam de células glandulares epiteliais secretoras - são, indiscutivelmente, os mais incidentes (BOSMAN, 2010; HUGEN et al., 2015).

Apesar dos avanços no entendimento da fisiopatologia do CCR, é fundamental assegurar aos pacientes mecanismos para o diagnóstico precoce, além de opções terapêuticas menos agressivas para o tratamento desta doença (OCHOA-CORTES et al., 2014). Por esse motivo, é de extrema importância elucidar as vias patofisiológicas associadas à ocorrência do CCR, a fim de garantir métodos de prevenção, diagnóstico e controle do desenvolvimento dos tumores colorretais.

Nesse sentido, diversos estudos com modelos experimentais animais e com o uso de linhagens celulares têm sugerido o envolvimento da sinalização purinérgica na fisiopatologia do CCR (GESSI et al., 2004; KUNZLI et al., 2011; WAN et al., 2016; DI VIRGILHO et al., 2017). Esse sistema é composto, especialmente, por nucleotídeos de adenina, seus respectivos receptores

de membrana celular (famílias P2X, P2Y e P1) e enzimas que degradam esses nucleotídeos - dentre elas podemos destacar a atividade da E-NTPDase (CD39 - que degrada ATP a ADP e ADP a AMP); a atividade da E-5'-nucleotidase (CD73 - que degrada AMP a adenosina); e a ação da adenosina desaminase (ADA - que degrada adenosina em inosina) (DI VIRGILHO et al., 2017).

Além do provável envolvimento do sistema purinérgico no desenvolvimento do CCR, evidências sugerem forte correlação entre os hábitos alimentares, principalmente pelo consumo de carne vermelha (KERR et al., 2017; HADJIPETROU et al., 2017) e a suplementação de ferro heme - que causam aumento de compostos nitrosos e radicais livres altamente reativos no trato intestinal - na patogenia desses tumores.

Nesse contexto, a patogênese do CCR parece estar diretamente relacionada à ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mucosa intestinal. De modo geral, a ação excessiva das EROs - sobre as células saudáveis - se sobrepõe a ação das defesas antioxidantes inatas e externas que atuam no organismo, causando danos ao material genético e, conseqüentemente, mutações que podem levar ao surgimento de células malignas (DASH et al., 2015).

A partir do momento em que as células malignas instalam-se definitivamente no tecido, burlando a capacidade do organismo de eliminá-las, dá-se início à formação do tumor propriamente dito. Em tumores mais agressivos, o crescimento acentuado do aglomerado celular ultrapassa a capacidade que o organismo tem de fornecer o aporte sanguíneo necessário para a manutenção das células na região central do tumor, iniciando-se, então, um extenso processo de necrose tecidual. Dessa forma, cria-se um círculo vicioso, onde as EROs desempenham papel fundamental para o surgimento das primeiras células neoplásicas, além de serem produzidas em maior quantidade conforme o processo de necrose avança (ZANINI, 2014).

Os mecanismos do estresse oxidativo que levam ao surgimento das células malignas abrangem diversos efeitos deletérios causados pelas EROs que, quando somados, acabam por superar a ação das defesas antioxidantes do organismo. Tais mecanismos são, por exemplo: a) dano direto ao DNA, particularmente importante quando ocorre em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor; b) inflamação, levando a situações de hipóxia e, portanto, dano celular com conseqüente produção de mais EROs; e c) supressão das próprias defesas antioxidantes do organismo, através, por exemplo, do bloqueio das cascatas enzimáticas responsáveis pela degradação de radicais livres, tais como a superóxido dismutase (SOD) (MARIANI; SENA; RONCUCCI, 2014).

Apesar de alguns estudos investigarem o envolvimento do sistema purinérgico ou do perfil

oxidativo em pacientes com neoplasias, ainda há carência de pesquisas que elucidem como as nucleotidases, os nucleotídeos e a adenosina, em conjunto com os processos oxidativos, estão agindo no desenvolvimento do CCR em humanos.

Sendo assim, considerando que: a) o CCR é um problema de saúde pública mundialmente relacionado, com altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade associadas; b) os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina e o estresse oxidativo podem desempenhar papel fundamental no desenvolvimento e na progressão do CCR; c) já se conhece o envolvimento da sinalização purinérgica e do estresse oxidativo em alguns tipos de câncer, porém poucos trabalhos científicos foram realizados buscando esclarecer o papel dos mesmos no desenvolvimento do CCR; torna-se de fundamental importância aprofundar o conhecimento a respeito do envolvimento das enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina e biomarcadores de estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão do CCR, a fim de promover melhorias no diagnóstico e no tratamento dos pacientes acometidos com essa patologia, diminuindo as taxas de morbidade e mortalidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade das enzimas do sistema purinérgico, em plaquetas, e o perfil oxidativo de pacientes com diagnóstico de câncer colorretal esporádico (CCR) do subtipo histológico adenocarcinoma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade das enzimas E-NTPDase e E-5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com diagnóstico de CCR do subtipo histológico adenocarcinoma e em indivíduos controle;
- Avaliar a atividades da ADA em plaquetas de pacientes com diagnóstico de CCR e em indivíduos controle;
- Verificar a atividade da MPO no plasma de pacientes com diagnóstico de CCR e em indivíduos controle;
- Verificar a atividade da enzima antioxidante SOD, em sangue total, de pacientes com diagnóstico de CCR e em indivíduos controle;

- Mensurar os níveis de T-SH, NPSH e VIT C em pacientes com diagnóstico de CCR e em indivíduos controle;
- Dosar os níveis de TBARS no soro de pacientes com diagnóstico de CCR e em indivíduos controle.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÂNCER COLORRETAL

A grande maioria dos casos de CCR são definidos como esporádicos (LICHTENSTEIN et al, 2000), uma vez que não apresentam caráter familiar e onde a ação de agentes cancerígenos atuando cronicamente sobre a mucosa intestinal aumenta o risco da doença. A história natural do CCR baseia-se principalmente na sequência adenoma - câncer, pois a maioria dos casos tem origem em pólipos adenomatosos (lesões benignas) que podem sofrer transformação maligna num período longo de tempo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; ØINES et al., 2017).

O CCR pode ter seu processo de carcinogênese subdividido em quatro etapas: i) iniciação (momento em que ocorre dano genético irreversível às células); ii) promoção (etapa marcada pela proliferação celular desregulada); iii) progressão (momento em que o tumor passa a adquirir características malignas) e, por fim; ii) metástase (migração de células cancerosas para outros órgãos e tecidos) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; C. KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

A fase de iniciação está correlacionada com: a) a idade do indivíduo e b) com fatores ambientais. Nesse sentido, indivíduos acima de 50 anos estão mais propensos a desenvolver CCR (POTTER, 1999; KEUM; GIOVANNUCCI, 2019; PACHECO-PEREZ et al, 2019) e fatores ambientais, tais como obesidade, consumo de álcool e tabagismo (DOS SANTOS et al.; 2019), além do consumo excessivo de carnes vermelhas e processadas, caracterizam-se como os principais fatores de risco ambientais para o desenvolvimento dessa neoplasia (SONG, GARRET, CHAN, 2015; DOS SANTOS et al.; 2019; MATTIUZZI; LIPPI, 2020).

Sequencialmente, a etapa de proliferação celular desordenada é evidenciada. Nessa fase, os protooncogenes e os genes supressores de tumor, quando sofrem modificações, tornam-se os principais responsáveis pelo crescimento celular desregulado, porque os protooncogenes modificados podem tornar-se oncogenes, e estes, por sua vez, provocam a proliferação celular excessiva e promovem a produção anormal de proteínas estimuladoras de crescimento (COSTA, 2015).

A partir dessa proliferação anormal, inicia-se a fase de promoção tumoral, na qual o sistema purinérgico atua como um dos principais agentes reguladores (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1998; ADINOLFI et al., 2012; BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013; ZANINI et al., 2019), podendo tanto corroborar com a multiplicação desregulada de células colorretais, como ocorre na ativação do receptor P2X7 (QIAN et al., 2017; ZHANG; DING; WANG, 2019), quanto contribuir para a supressão tumoral, como ocorre quando um receptor P2Y12 é desativado por um antagonista irreversível (BELLEFEUILLE; MOLLE; GENDRON, 2019). Nesse ponto, é possível perceber que a promoção tumoral pode ser estimulada ou suprimida pela sinalização purinérgica, indicando que o conhecimento ampliado dessa via de sinalização é fundamental para compreender em profundidade a carcinogênese colorretal.

Por fim, a metástase é a fase marcada pela disseminação de células cancerosas do órgão primário para outros órgãos ou tecidos por meio da corrente sanguínea ou sistema linfático (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019). Ela é responsável por cerca de 90% das mortes relacionadas ao câncer e esse processo complexo continua sendo o aspecto mais obscuro da biologia do câncer.

É importante destacar que após o diagnóstico do CCR, é necessário realizar o estadiamento tumoral, a fim de preconizar melhores estratégias de tratamento e se estabelecer o prognóstico da doença. O sistema de estadiamento *tumour-node-metastasis* (TNM) da *American Joint Committee on Cancer* e da *Union for International Cancer Control* (AJCC/UICC) é, atualmente, o mais recomendado para este fim. O TNM consiste na avaliação de três critérios relacionados ao tumor: grau de invasão do tumor na parede do cólon (T), acometimento dos linfonodos regionais (N) e presença de metástases a distância (M) (SHIA et al, 2012; BRUNI, ANGELL & GALON, 2020).

Cada critério citado anteriormente conta com subdivisões para uma melhor classificação. A classificação do tumor primário T é descrita como: Tx quando o tumor primário não pôde ser avaliado; T0 quando não há evidências de tumor primário; *Tis* carcinoma *in situ*; T1 havendo invasão da submucosa; T2 invasão da muscular própria; T3 já se encontra em tecido pericólico; T4 quando o tumor invadiu outros órgãos ou estruturas ou perfura o peritônio visceral.

O acometimento dos linfonodos regionais segue a mesma regra: Nx quando não foram avaliados, N0 não havendo metástase nestes linfonodos, N1 quando há de 1 a 3 linfonodos acometidos e N2 quando quatro ou mais linfonodos regionais foram invadidos. Por fim, tem-se a classificação das metástases a distância: Mx quando não se pôde avaliar, M0 não havendo metástase a distância e M1 quando há presença de metástases distantes. Entretanto, indivíduos com o mesmo estadiamento podem ter prognósticos diferentes (SHIA et al, 2012).

Apesar dos avanços significativos tanto no entendimento do processo patológico do CCR, assim como no diagnóstico e tratamento dessa neoplasia, as bases biológicas e moleculares ainda não estão totalmente estabelecidas e a grande maioria dos pacientes com doença metastática avançada enfrenta uma doença terminal que, com raras exceções, é incurável pela aplicação dos protocolos terapêuticos atuais (TALMADGE; FIDLER, 2010; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

Diante disso, evidencia-se que o diagnóstico precoce é fundamental para a diminuição da mortalidade por CCR. Na atualidade, ele é realizado por meio de exames de triagem, destacando-se a colonoscopia como o padrão ouro (FEY et al., 2010), e, nesse contexto, a descoberta de marcadores bioquímicos que possam auxiliar no processo diagnóstico pode configurar um avanço expressivo na qualidade de vida e sobrevida de pacientes com CCR.

Em relação aos fatores de risco, o CCR pode-se desenvolver a partir de fatores genéticos e ambientais (HADJIPETROU et al., 2017). Em relação aos fatores ambientais, evidências sugerem o envolvimento de fatores alimentares, dentre eles, os principais são o consumo de carne vermelha (KERR et al., 2017; HADJIPETROU et al., 2017) e a suplementação de ferro heme, que causam aumento de compostos nitrosos nas fezes e, conseqüentemente, apresentam contato direto com a mucosa do intestino. A obesidade, o diabetes e o sedentarismo também são fatores de risco importantes devido ao aumento da inflamação sistêmica e intestinal (HADJIPETROU et al., 2017). Aqui é preciso ressaltar que o aumento da inflamação intestinal - cronicamente, mesmo que de baixo grau, tem o potencial de gerar lesões malignas nas células do cólon e do reto. Neste sentido, pacientes com CCR geralmente apresentam níveis elevados de marcadores inflamatórios como proteína C-reativa e citocinas pró-inflamatórias (ABAR et al., 2017).

3.2 SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER COLORRETAL

Os eventos associados à etapa de proliferação de células tumorais gera um microambiente inflamatório, favorável para a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) - visto que na tumorigênese há um processo dinâmico entre proliferação e lesão/destruição celular. Um desses DAMPs é o nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP).

Nas doenças neoplásicas o ATP tem um papel crucial de ativar células inflamatórias, sendo um importante componente da sinalização purinérgica envolvido no desenvolvimento e na progressão de neoplasias. O sistema purinérgico é composto por moléculas sinalizadoras (ATP, ADP, AMP e adenosina), enzimas que degradam esses nucleotídeos e nucleosídeo de adenina,

além de receptores purinérgicos compostos pelas: a) família P1: (A₂, A_{2A}, A_{2B} e A₃) e; b) família P2 (P_{2X1-7} e P_{2Y 1,2,4,6,12,14}) (DI VIRGÍLIO; 2012).

Os nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares participam de diferentes processos celulares, como estímulo ou inibição da apoptose, proliferação, migração, diferenciação, secreção de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios - principalmente em relação ao nucleosídeo adenosina e aos nucleotídeos (ATP e ADP) . Sendo assim, processos patológicos como o do câncer podem ser modulados pela sinalização purinérgica (DI VIRGÍLIO; ADINOLFI, 2017).

Muitos estudos demonstram o efeito da sinalização purinérgica sobre o crescimento celular, sendo que o ATP está intimamente envolvido no metabolismo celular do câncer e na imunidade antitumoral (DI VIRGÍLIO, 2012). O nucleosídeo adenosina, por sua vez, encontra-se em níveis elevados durante o desenvolvimento de tumores, e é capaz de induzir o crescimento e desenvolvimento das células cancerosas através de mecanismos como a indução de angiogênese (MALDONADO et al., 2012). Sendo assim, a presença e concentração de adenosina na corrente sanguínea pode desencadear uma ampla variedade de ações quando ligada a receptores específicos (ROBSON et al., 2006; YEGUTKIN, 2008).

As ectonucleotidases, que são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos até seus respectivos nucleosídeos, constituem uma cascata enzimática altamente eficiente e elas são responsáveis pelo controle da concentração e do tempo em que essas moléculas sinalizadoras permanecem no meio extracelular estimulando seus receptores (ZIMMERMANN, 2006).

São exemplos de ectonucleotidases os membros da família ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase1 (CD39), 2, 3 e 8), a ecto-5'-nucleotidase (CD73) e a ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase, que estão localizadas na superfície celular e exibem um sítio catalítico voltado para o espaço extracelular. A enzima CD39 catalisa ATP e ADP em AMP, que é subsequentemente convertido em adenosina pela ecto-5'-nucleotidase, também conhecida como CD73.

Tanto a CD39 quanto a CD73 estão expressas em diferentes células e tecidos, podendo-se destacar a abundante expressão da CD39 nas células endoteliais e nas células musculares lisas, nas células dendríticas e nos linfócitos (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006) e a CD73 sendo expressa no cólon, rim, cérebro, fígado, coração e pulmão (MORIWAKI et al., 1999; ZIMMERMANN, 1992, 2006). Ademais, ambas estão expressas em plaquetas (LUNKES et al., 2003; LUNKES et al., 2008; DEAGLIO & ROBSON, 2011), fator que fundamenta a execução dos protocolos experimentais deste trabalho nessas estruturas.

A ectoenzima adenosina desaminase (ADA), tem como função promover a desaminação hidrolítica, na superfície celular, da adenosina em inosina, sendo que sua deficiência contribui para condições patológicas devido ao aumento anormal das concentrações de adenosina extracelular (MARTINS et al., 2016). A adenosina é um biomarcador de dano celular - mediando ações anti-inflamatórias, além de ser uma potente molécula imunossupressora. Ela também desempenha um papel protetor através da liberação de neurotransmissores, atua no estímulo à migração celular, inibe a agregação plaquetária e age como vasodilatador (SOUZA et al., 2012; DI VIRGILIO; VUERICH, 2015). Posteriormente, a adenosina é convertida pela enzima ADA em inosina e hipoxantinas (ROBSON et al., 2006; YEGUTKIN, 2008).

O estudo sobre as implicações do sistema purinérgico em diversos tipos de câncer vem se tornando uma importante ferramenta para desvendar mecanismos patológicos (ARAÚJO et al., 2005; ZANINI et al., 2012). O ATP liberado pelas células neoplásicas disfuncionais favorece o desenvolvimento de processo inflamatório crônico, através da ativação de receptor P2X7 e, conseqüentemente, da secreção de citocina pró-inflamatória, a exemplo da IL-1 β e da IL-18 (PELEGRIN & SURPRENANT, 2009). Além do envolvimento nos eventos inflamatórios, o receptor P2X7 está sendo associado ao desenvolvimento de tumores que evoluem clinicamente de modo agressivo e que apresentam mau prognóstico em pacientes com CCR (QIAN et al., 2017). Estudos mostraram uma correlação positiva entre a expressão de receptor P2X7 e de GLUT-1 em pacientes com CCR, sugerindo que, dessa maneira, as células tumorais tenham aporte energético suficiente para seu desenvolvimento (ZHANG; DING; WANG, 2019).

Adicionalmente, em um estudo recente com tumores colorretais, o receptor P2X7 mostrou-se superexpresso nas amostras tumorais em relação aos tecidos normais, e esta alta expressão se correlacionou com o tamanho do tumor, metástases linfáticas e estadiamento TNM, sendo que a expressão deste receptor pode servir como um fator prognóstico com potencial terapêutico (QIAN et al., 2017). Assim, pode-se atribuir ao receptor P2X7 muitas ações no desenvolvimento de células neoplásicas, uma vez que o mesmo está sendo considerado um importante mediador de invasão tumoral, facilitando a ocorrência de metástases (ZHANG; DING; WANG, 2019).

As ações do ATP foram estudadas em outros receptores purinérgicos, além do P2X7. Estudo com duas linhagens celulares de CCR (HCT8 e Caco-2) mostrou que elas expressam o RNAm dos receptores P2Y1, 2, 4, 6, 11 e 12, e as proteínas de P2Y1 e P2Y2. No mesmo trabalho foi demonstrado que ATP em altas concentrações induz apoptose nessas linhagens celulares,

através do receptor P2Y1, e em baixas concentrações estimula a proliferação das células de CCR, provavelmente atuando nos receptores P2Y2 (WAN et al., 2016).

Reforçando o envolvimento da sinalização purinérgica no desenvolvimento e progressão do CCR, estudo evidenciou que a deleção genética de CD39 pareceu atrasar o crescimento tumoral e a angiogênese em modelos de camundongos. Dados sugerem que CD39 e as alterações na sinalização purinérgica têm efeitos moduladores sobre a disseminação do CCR, e os baixos níveis de RNAm de CD39 no tumor correlaciona-se com o aumento da sobrevivência e formação tardia de metástases hepáticas (KÜNZLI et al., 2011). Por tudo isso, a ação catalítica das enzimas do sistema purinérgico sobre os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina contribuem, de fato, na modulação da proliferação e apoptose de células de CCR.

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER COLORRETAL

A patogênese do CCR parece estar diretamente relacionada à ação de EROs na mucosa intestinal. As EROs, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e outros oxidantes, formam-se fisiologicamente em proporções controladas por mecanismos de defesa celular. Porém, em algumas condições patológicas, como nos processos inflamatórios crônicos e doenças neoplásicas, essa produção de EROs pode aumentar substancialmente, resultando em estresse oxidativo (SCHMATZ, 2012).

O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (CONCEIÇÃO et al., 2017).

As EROs apresentam potencial para causar danos irreversíveis em biomoléculas importantes, tais como lipídeos de membrana, proteínas e DNA, através de sua capacidade de induzir alterações bioquímicas (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003; WU et al., 2004). É importante frisar, aqui, que as células do tumor são conhecidas por serem os principais responsáveis pela produção e liberação de EROs na circulação (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004) e, para tanto, vários mecanismos que conduzem ao estresse oxidativo, foram propostos em pacientes com câncer, dentre eles encontramos alterações no metabolismo energético (BAKAN et al., 2003), a inflamação crônica não-específica e por fim o uso de drogas antineoplásicas (BAKAN et al., 2003).

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

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

Os efeitos nocivos das EROs são equilibrados pela ação dos sistemas antioxidantes. Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, é qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração se comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Entre os antioxidantes enzimáticos, o sistema composto pela atividade de enzimas SOD e CAT é o mais eficiente (BONNEFOY et al., 2002), cumprindo destacar que a detoxificação das EROs envolve um mecanismo de elevada sincronia, em que as enzimas antioxidantes atuam de maneira cooperativa.

A SOD é responsável por catalisar a conversão do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou oxigênio molecular, produtos estes, menos reativos (HAO; LIU, 2019). Ela é considerada a primeira linha de defesa antioxidante enzimática e, nos mamíferos, apresenta-se sob três isoformas: citoplasmática (SOD1), mitocondrial (SOD2) e extracelular (SOD3), sendo que todas elas requerem metal catalítico, cobre ou manganês, para sua ativação (MIAO; ST CLAIR, 2009). A SOD juntamente com a CAT atuam em sinergismo e refletem a capacidade celular de remover EROS e proteger os tecidos dos danos que estas podem causar (HAO; LIU, 2019).

No contexto do estresse oxidativo, dá-se destaque também a atividade da MPO. Ela é membro do grupo das heme peroxidases, sendo distinguida das demais por uma propriedade única de oxidar o ânion cloreto (Cl^-) a ácido hipocloroso (HClO) em condições fisiológicas, além de produzir outras espécies oxidativas, como ácido hipobromoso e hipotiocianoso. Essa enzima oxidante é expressa em leucócitos, principalmente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, atuando especialmente como agente microbicida (VANHAMME et al., 2018). Entretanto, a MPO parece possuir também um importante papel na iniciação e progressão tumoral, e apresentar caráter protetor ou prejudicial, a depender dos níveis de sua atividade do ambiente tumoral (RONCUCCI et al., 2008; DROESER et al., 2013; VANHAMME et al., 2018).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, também possuem grande relevância no controle dos processos oxidativos os antioxidantes não enzimáticos. Sabe-se que o organismo tem a capacidade de produzir compostos que apresentam grande capacidade de defesa antioxidante, direta ou indireta, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). É especialmente importante destacar, entre os antioxidantes não enzimáticos, os compostos contendo grupos sulfidríla (SH), chamados tióis, cuja capacidade para evitar a oxidação se deve, geralmente, ao átomo de enxofre que pode facilmente acomodar a perda de elétron (MASELLA et al., 2005). Para a avaliação dos T-SH, faz-se a dosagem tanto os tióis intracelulares como extracelulares, nas formas protéica (unido a proteínas, principalmente albumina) e não-protéica (glutathiona, majoritariamente) (CHIANEH; PRABHU, 2014; DIRICAN et al., 2016), enquanto a dosagem dos NPSH concentra-se somente na segunda forma, tendo como composição principal a glutathiona (GSH) (CHIANEH; PRABHU, 2014; DIRICAN et al., 2016).

Além dos tióis, outra molécula antioxidante fundamental para a manutenção da homeostase do organismo é a vitamina C (VIT C). A VIT C é um composto hidrossolúvel, presente em grande parte dos vegetais e frutos, e desempenha papel fundamental nas reações de oxi-redução nas células, agindo como um transportador de hidrogênio ou como um captador de moléculas isoladas de oxigênio (O_2). A VIT C é amplamente utilizada na clínica médica, sendo importante no tratamento de patologias como o câncer.

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

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Destaca-se que este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS, sob protocolo número: 87508918.4.0000.5564.

Com relação à seleção da amostra, a amostragem foi feita por conveniência e, a partir de dados relativos ao número de pacientes com CCR no município de Chapecó, foi realizado o cálculo amostral, chegando-se ao número de 50 pacientes. Contudo, pela condição pandêmica, por limitações temporais e por outros entraves para o acesso de pacientes, o tamanho amostral do

presente estudo foi de 30 pacientes. Nessa pesquisa foram avaliadas as atividades de enzimas do sistema purinérgico e parâmetros de estresse oxidativo em 30 indivíduos recém diagnosticados com CCR, anteriormente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico, e em 30 indivíduos saudáveis. Os pacientes foram selecionados a partir de contato prévio dos pesquisadores com o médico Cirurgião Oncológico responsável pela avaliação dos pacientes no Hospital regional do Oeste (HRO) e os pacientes selecionados foram informados pelos pesquisadores sobre os objetivos da pesquisa e sobre as intervenções que seriam realizadas através da apresentação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Nos participantes da pesquisa, foi realizada coleta de sangue, 30 mL, por punção venosa. As análises bioquímicas foram realizadas nos laboratórios de pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - *Campus* Chapecó (SC). As informações de prontuário médico foram obtidas nas pastas dos pacientes arquivadas no HRO, e foram utilizadas para complementar as análises biológicas. A partir dessa análise, foi realizada a comparação dos resultados obtidos entre os grupos e a verificação de alterações nos sistemas biológicos avaliados devido à presença do tumor.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes voluntários, com idade entre trinta (30) anos completos e setenta (70) anos, com diagnóstico realizado por médico oncologista ou proctologista conforme CID 10 de CCR esporádico do subtipo histológico adenocarcinoma, sem história familiar da doença;
- Não ter realizado a remoção cirúrgica do tumor ou iniciado o tratamento farmacológico no momento da participação no estudo;
- Os indivíduos controle selecionados serão voluntários, com idade entre trinta (30) anos completos e setenta (70) anos, que não apresentem patologia ativa aguda ou crônica ou histórico de CCR.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes que apresentarem qualquer outra patologia fora o CCR esporádico do subtipo histológico adenocarcinoma, e/ou que já tenham realizado a remoção cirúrgica do tumor ou iniciado o tratamento farmacológico; e/ou que não respeitem os limites de idade ao diagnóstico; e/ou que apresentem história familiar da doença;
- Indivíduos controle que apresentarem qualquer tipo de patologia ativa aguda ou crônica, e/ou que estiverem fazendo uso de qualquer medicamento; e/ou que não respeitem os limites de idade

definidos; e/ou que apresentem história familiar da doença.

5 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para este estudo, foram selecionados por conveniência trinta (n= 30) pacientes com diagnóstico de CCR esporádico do subtipo histológico adenocarcinoma, e trinta (n= 30) indivíduos controle, pareados por idade e sexo, na cidade de Chapecó (SC), seguindo os critérios de inclusão e de exclusão.

Logo após o diagnóstico, os indivíduos foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, e foram convidados a participar do mesmo, consentindo, através de assinatura do TCLE, a fornecer as informações dos laudos do exame de colonoscopia realizado e dos prontuários médicos. Após, foi realizada coleta de: a) sangue em tubos *vacutainer* com citrato como anticoagulante (para o isolamento do *pellet* de plaquetas e obtenção de sangue total citratado); b) sangue em tubos *vacutainer* com EDTA como anticoagulante (para a separação do plasma) e; c) sangue em tubos *vacutainer* com ativador de coágulo (para a separação do soro). A coleta de sangue dos pacientes e controles foi realizada em um único momento, após o resultado do exame de colonoscopia realizado, e antes do início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico do CCR no caso dos pacientes. As amostras separadas de plaquetas, sangue total, plasma e soro foram congeladas em freezer a -80 °C para as posteriores análises. As informações obtidas a partir dos prontuários médicos foram em relação à idade, sexo, subtipo histológico do CCR, estágio tumoral, metástases, história familiar de câncer, doenças inflamatórias intestinais e doenças crônicas.

5.2 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

5.2.1 Determinação da atividade da E-NTPDase e E-5'-nucleotidase

As atividades das enzimas E-NTPDase e E-5'-nucleotidase foram determinadas, em plaquetas, segundo Pilla et al. (1996) modificado por Lunkes et al. (2003).

5.2.2 Determinação da atividade da ADA

A atividade da ADA, em plaquetas, foi determinada de acordo com o protocolo já descrito por Giusti e Galanti (1984).

5.2.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO no plasma foi realizada de acordo com o protocolo descrito por KAYYALI et al. (1991).

5.2.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD, em sangue total, foi realizada pelo sistema de detecção adrenalina-adenocromo de acordo com o descrito por MC CORD e FRIDOVICH (1969).

5.2.5 Determinação dos grupamentos SH totais (T-SH) e não proteicos (NPSH)

Foi realizada em amostras de soro segundo o método descrito por ELMANN (1959).

5.2.6 Dosagem de Vitamina C no plasma

Foi realizada de acordo com a metodologia descrita por JACQUES-SILVA et al. (2001).

5.2.7 Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foram determinadas no soro, através do método de JENTZSCH et al. (1996) modificado.

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística foi utilizado o Teste *t* de *Student*. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0.05$ e foram expressos como média \pm desvio padrão. Para a verificação da normalidade dos resultados, previamente foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos realizados foram submetidos à avaliação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre Pesquisa envolvendo seres humanos.

Para participar do estudo, os indivíduos selecionados concordaram com o exposto no TCLE (ANEXO I), fornecido pelos pesquisadores. Todos os participantes da pesquisa foram advertidos acerca dos riscos e benefícios trazidos pela sua participação e pelo procedimento de coleta, sendo que dados pessoais são mantidos em sigilo e cada indivíduo foi identificado por um número distinto. O material coletado está em posse da pesquisadora responsável e será mantido em armário com cadeado, na sala da pesquisadora, nas dependências da UFFS, ou em freezer no

laboratório de pesquisa, o qual apenas os pesquisadores envolvidos têm acesso. Após o período de cinco anos, os arquivos (físicos ou digitais) serão destruídos.

7 RESULTADOS

Pela análise da Tabela 1 podemos observar características gerais relacionadas à população amostral tal como idade, gênero, frequência no consumo de carnes vermelhas, álcool, frutas e legumes. Como é possível observar, o grupo de pacientes foi composto por 30 indivíduos (63,3% do gênero masculino e 36,6% do gênero feminino). Além disso, em relação à idade dos pacientes, quase 45% deles estão na faixa etária entre 50 a 59 anos de idade. Em relação ao consumo de carnes vermelhas, quase metade dos pacientes (46,15%) consomem carne vermelha todos os dias da semana.

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes e controles

Característica	Pacientes	Controles
<i>Idade</i>	entre 30 e 39 anos: 3,33% entre 40 e 49 anos: 3,33% entre 50 e 59 anos: 43,33% entre 60 e 69 anos: 26,33% entre 70 e 79 anos: 23,33%	entre 30 e 39 anos: 14,28% entre 40 e 49 anos: 23,80% entre 50 e 59 anos: 52,38% entre 60 e 69 anos: 4,76% entre 70 e 79 anos: 4,76%
<i>Gênero</i>	masculino: 63,33% feminino: 36,60%	masculino: 52,38% feminino: 47,61%
<i>Frequência no consumo de carnes vermelhas</i>	todos os dias da semana: 46,15% 3 vezes na semana: 30,76% 1 vez na semana: 23,07%	todos os dias da semana: 36,84% 3 vezes na semana: 57,89% 1 vez na semana: 5,26%
<i>Frequência no consumo de álcool</i>	1 vez na semana: 53,84% Outros: 23,07% Nunca: 23,07%	1 vez na semana: 52,63% Outros: 21,05% Nunca: 26,31%
<i>Frequência no consumo de frutas e legumes</i>	todos os dias da semana: 69,23% 3 vezes na semana: 30,76%	todos os dias da semana: 84,21% 3 vezes na semana: 15,78%

A Tabela 2 apresenta as informações a respeito do estadiamento tumoral dos pacientes envolvidos no estudo. Nota-se que não foi possível coletar o estadiamento TNM de 8 pacientes, uma vez que estes não constavam em prontuário.

Tabela 2 - Classificação do estadiamento tumoral dos pacientes com CCR

Pacientes	Gênero	Idade	TNM	Estágio
1	F	37	T3N0M0	IIA
2	M	58	T3N1M0	IIA
3	F	56	T3N2M1	IIA
4	M	51	T3N0M0	IIA
5 *	M	74	T4N1Mx	IIB
6	M	55	T3N2M0	IIA
7	M	68	T2N0Mx	IIB
8	F	61	T3N0M0	IIA
9	F	64	-	-
10	M	57	-	-
11	F	71	T3N1Mx	IIA
12	F	41	T3N1M0	IIA
13	F	74	T3N1Mx	IIA
14	M	59	T3N0M0	IIA
15	F	52	T3N1M0	IIA
16 *	M	57	T4N1M1	IIB
17	M	53	T3N1M1	IIA
18	M	63	T4N1M1	IIB
19	M	57	T3N0M0	IIA
20	M	63	T1N1Mx	I
21	M	73	T3N1Mx	IIA
22	M	75	T1N0Mx	IB
23	M	70	-	-
24	M	55	-	-
25	M	56	-	-
26	F	73	T2N0M	I
27	F	34	-	-
28	M	69	T3NO	IIA
29	F	68	-	-
30	M	58	-	-

Fonte: elaborada pelos autores.

Notas: * Pacientes que vieram a óbito. F, feminino. M, masculino.

Pela análise da Tabela 2 observamos que 50% dos pacientes envolvidos no estudo (n=15) apresentam-se no estágio IIA de desenvolvimento tumoral. Além disso, 13,3% dos pacientes (n=4) estão no estágio I e 10% dos pacientes (n=3) estão no estágio IIB de desenvolvimento tumoral. Infelizmente, pela falta de dados no prontuário, não foi possível classificar o estadiamento de

26,66% dos pacientes (n=8) e dois pacientes evoluíram a óbito.

Podemos observar, pela análise da Figura 1, que a atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ATP foi maior no grupo de pacientes com CCR do que no grupo de indivíduos controle [$35,86 \pm 4,62$ vs. $78,90 \pm 9,60$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e pacientes, respectivamente].

Resultado semelhante foi observado para a atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ADP. De acordo com a Figura 2, a hidrólise do ADP foi significativamente maior no grupo de pacientes com CCR do que no grupo de indivíduos controle [$84,68 \pm 9,88$ vs. $123,10 \pm 14,84$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e pacientes, respectivamente].

A Figura 3 representa a atividade da E-5'-nucleotidase. Em relação à hidrólise do AMP, também observamos maior atividade hidrolítica da E-5'-nucleotidase no grupo de pacientes com CCR do que no grupo de indivíduos controle [$19,96 \pm 3,16$ vs. $86,92 \pm 13,89$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e pacientes, respectivamente].

Em relação à atividade da ADA (Figura 4) observamos que não houve diferença significativa na atividade dessa enzima entre o grupo de pacientes com CCR, quando comparado com grupo de indivíduos saudáveis [$2,03 \pm 0,47$ vs. $2,52 \pm 0,49$ UI/mg de proteína, em controles e pacientes, respectivamente].

Sobre a atividade da MPO (Figura 5), foi observada uma diminuição significativa na atividade dessa enzima no grupo de pacientes com CCR quando comparado com o grupo de indivíduos controle [$2,32 \pm 0,27$ vs. $3,55 \pm 0,25$ μ M de quinoneimina, em pacientes e controles respectivamente].

A Figura 6 representa a atividade da SOD. Nesse estudo foi possível observar um aumento estatisticamente significativo na atividade dessa enzima no grupo de pacientes com CCR quando comparado com o grupo de indivíduos controle [$1180 \pm 16,69$ vs. $1095 \pm 16,90$ UI/mg de proteína, em pacientes e controles respectivamente].

As Figuras 7 e 8 representam, respectivamente, os níveis de T-SH e NPSH. Não foi observada diferença significativa nos níveis séricos de T-SH entre o grupo de pacientes com CCR, quando comparado com grupo de indivíduos saudáveis [$1,35 \pm 0,16$ vs. $1,26 \pm 0,11$ μ mol/mL de soro, em controles e pacientes, respectivamente]. No entanto, foi observado um aumento nos níveis séricos de NPSH no grupo de pacientes com CCR quando comparado com o grupo de indivíduos controle [$0,16 \pm 0,01$ vs. $0,13 \pm 0,01$ μ mol/mL de soro, em pacientes e controles respectivamente].

Em relação aos níveis plasmáticos de VIT C, foi observado um aumento desses níveis no

grupo de pacientes com CCR quando comparado com o grupo de indivíduos controle (Figura 9) [$14,06 \pm 0,42$ vs. $12,62 \pm 0,27$ $\mu\text{mol/mL}$ de plasma, em pacientes e controles respectivamente].

A Figura 10 representa os níveis de TBARS no soro. Foi identificado um aumento nos níveis séricos de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no grupo de pacientes com CCR do que no grupo de indivíduos controle [$32,62 \pm 1,44$ vs. $36,59 \pm 1,19$ nmol MDA/mL de soro, em controles e pacientes, respectivamente].

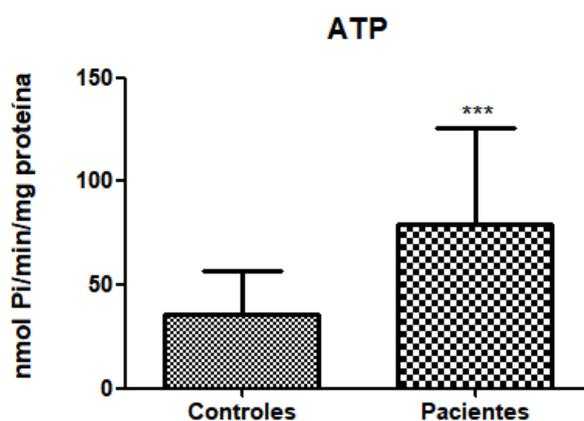


Figura 1 - Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP em plaquetas de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 28$). $*p \leq 0.0005$

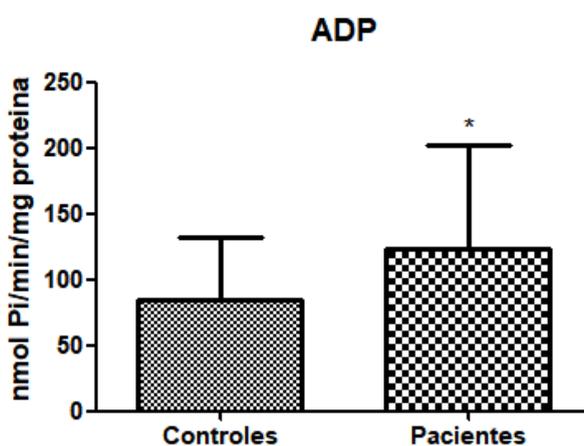


Figura 2 - Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP em plaquetas de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 28$). $*p \leq 0.05$

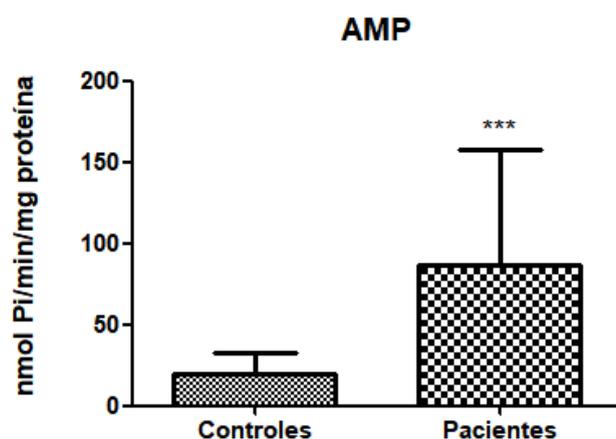


Figura 3 - A atividade da E-5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com câncer de colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28). *p \leq 0.0005

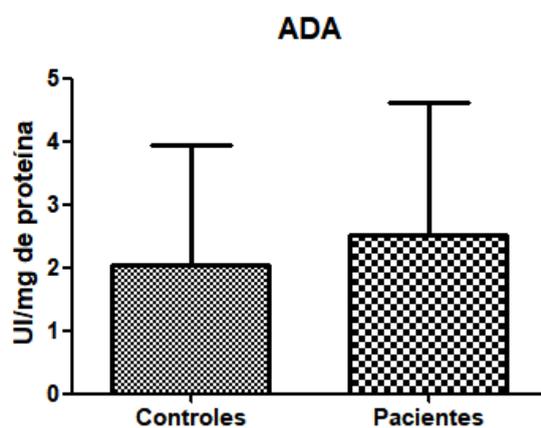


Figura 4 - Atividade da ADA nas plaquetas de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28).

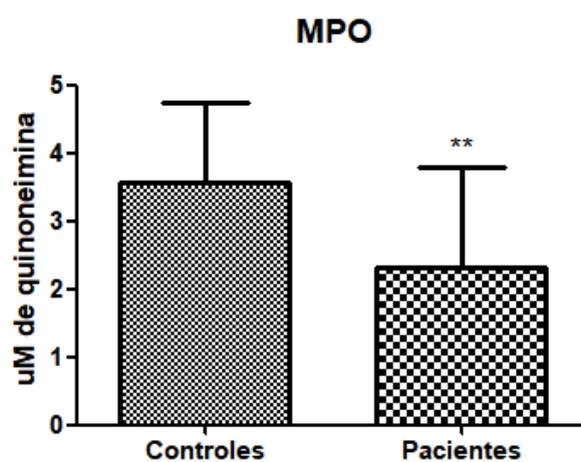


Figura 5 - Atividade da MPO no plasma de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 27). * $p \leq 0.005$

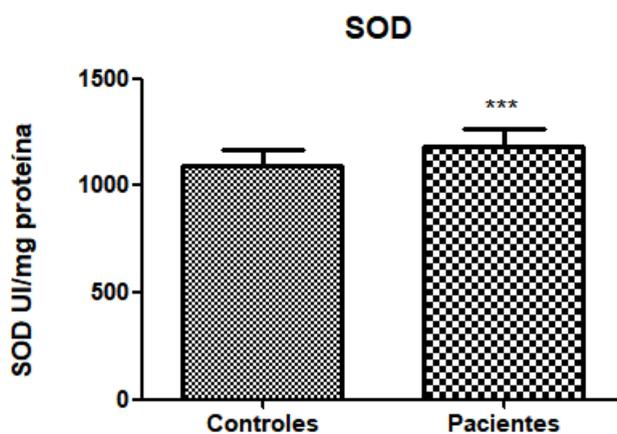


Figura 6 - Atividade da SOD em sangue total de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28). * $p \leq 0.0005$

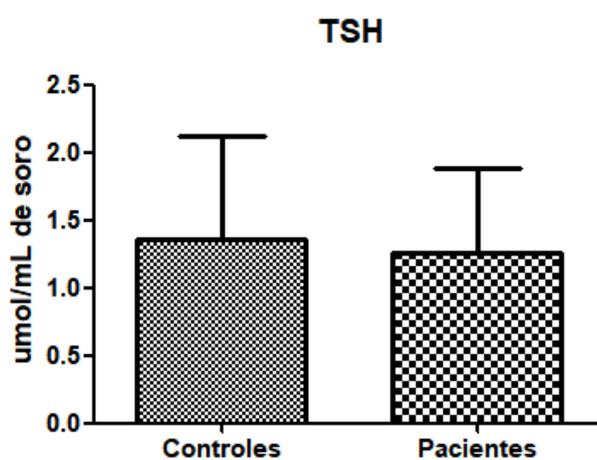


Figura 7 - Níveis séricos de T-SH de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28).

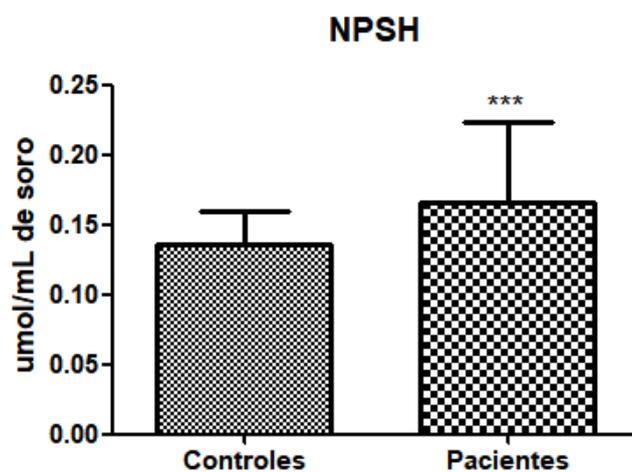


Figura 8 - Níveis séricos de NPSH de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28). * $p \leq 0.0005$

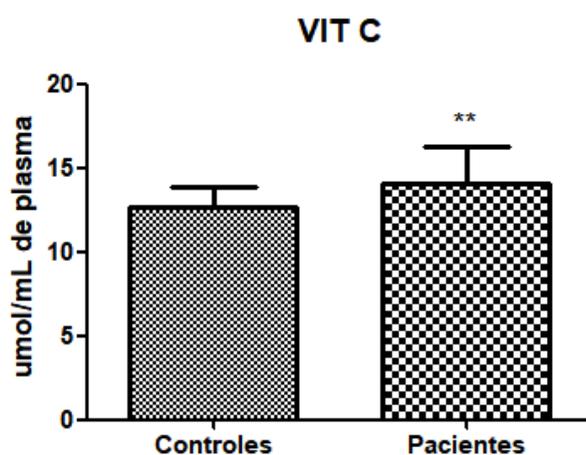


Figura 9 - Níveis plasmáticos de VIT C de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 27). * $p \leq 0.005$

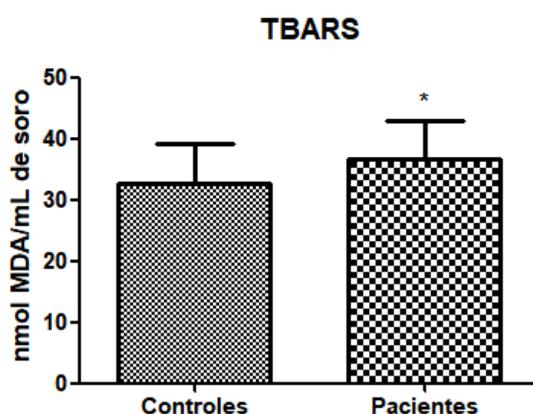


Figura 10 - Níveis de TBARS em soro de pacientes com câncer colorretal. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 28). * $p \leq 0.05$

8 DISCUSSÃO

Segundo a OMS, foram estimados mais de 1,9 milhão de novos casos de CCR, mundialmente, para o ano de 2020 e, não bastasse a elevada incidência, essa doença também se destaca em termos de letalidade para as neoplasias, sendo o segundo câncer mais mortal do mundo (SUNG et al., 2021).

O CCR é uma doença que atinge tanto homens quanto mulheres e apresenta três padrões de origem distintos: a) esporádico; b) hereditário; c) familiar (PASTOR, 2014). Desses, a forma

esporádica é predominante e apresenta-se em cerca de 80% dos pacientes (YU et al., 2003; DANTAS et al., 2009). Esses dados epidemiológicos reforçaram a definição da nossa população amostral, sugerindo que a frequência de CCR esporádico na população em estudo é superior aos casos hereditários/familiares. Vale destacar que apenas 5% dos CCR apresentam caráter hereditário e são causados por predisposições tumorais penetrantes, autossômicas dominantes ou recessivas, incluindo a síndrome de Lynch, a polipose adenomatosa familiar (FAP), a polipose associada ao MUTYH (MAP) e a síndrome de polipose hamartomatosa (KANTH et al., 2017; HEINIMANN, 2018; CUNNINGHAM et al., 2022).

Adicionalmente, os fatores de risco para o aparecimento de CCR esporádico podem ser classificados como modificáveis ou não modificáveis (ARNOLD et al., 2017). Dentre os fatores de risco modificáveis predominantes pode-se mencionar principalmente aqueles relacionados às características e aos hábitos do indivíduo, tais como idade igual ou acima de 50 anos; obesidade; inatividade física; tabagismo prolongado; alto consumo de carne vermelha ou processada; baixa ingestão de cálcio; consumo excessivo de álcool e alimentação pobre em frutas e fibras (ARAÚJO et al., 2001; HE, EFRON 2011).

De acordo com os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCR descritos na literatura, destaca-se que a maior parte dos pacientes com CCR envolvidos neste estudo apresenta faixa etária entre 50 a 59 anos e que a maioria dos pacientes consome carne vermelha diariamente. Os estudos destacam que o ferro heme, contido na carne vermelha, induz a ocorrência de estresse oxidativo e a formação de compostos N-nitrosos (NOCs). Os NOCs induzem a carcinogênese e promovem a proliferação de células epiteliais colorretais, devido a danos ao proto-oncogene KRAS e aos supressores tumorais *APC* e *TP53* (SONG; GARRET; CHAN, 2015; DOS SANTOS, 2019).

Ainda, estima-se que 70% das neoplasias colorretais sejam adenocarcinomas e que tenham se desenvolvido a partir de pólipos adenomatosos, que podem ser definidos como massas de displasia epitelial a partir da multiplicação descontrolada das células da cripta intestinal (DE LEON; DI GREGORIO, 2001; PERŠE, 2013; FREITAS et al., 2020). A partir dessa proliferação anormal, inicia-se a fase de promoção do tumor, na qual o sistema purinérgico atua como um dos principais agentes reguladores (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1998; ADINOLFI et al., 2012; BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013; ZANINI et al., 2019).

Nesse contexto, no que diz respeito à atividade das enzimas do sistema purinérgico como a E-NTPDase, a E-5'-nucleotidase e a ADA, nossos resultados demonstraram aumento na

atividade da E-NTPDase e da E-5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com CCR. Similarmente, outros trabalhos desenvolvidos por estudiosos da sinalização purinérgica verificaram que a hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina também está alterada em uma série de neoplasias como no câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão e câncer de colo uterino (ARAÚJO et al., 2005; MALDONADO et al., 2010, ZANINI et al., 2012; BATTISTI et al., 2013).

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

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

Sendo assim, é notório que o processo tumoral do CCR favorece a injúria e lesão de células da mucosa intestinal, favorecendo a liberação de ATP para o meio extracelular - que irá propiciar a formação de um microambiente pró-inflamatório que é amplificado a medida que a progressão tumoral se estabelece. É evidente, também, que a disponibilidade de ATP extracelular favorece a atividade máxima da NTPDase, que terá sua atividade potencializada, haja vista a presença de substrato em elevadas concentrações.

Além da relação entre processo inflamatório e desenvolvimento tumoral, a ocorrência de processos trombóticos em pacientes com câncer também é frequentemente relatada na literatura médica (KARIMI; COHAN, 2010). A primeira associação entre trombose e câncer foi descrita em

1865 por Armand Trousseau e, atualmente, o tromboembolismo venoso é caracterizado como uma das principais complicações observadas em pacientes com tumores.

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

No cenário observado a partir das análises dos nossos resultados, verificamos que a maior atividade da NTPDase para a hidrólise de ATP gera, sequencialmente, ADP - que apresenta proeminente atividade pró-agregante. O estímulo das plaquetas pelo ADP leva a mudança no formato, na agregação e na geração de TxA₂ e a co-estimulação de receptores P2Y1 e P2Y12 é requerida para a indução da agregação plaquetária pelo ADP (KAHNER et al., 2006). Não bastasse, o estímulo do receptor P2X1 pelo ATP está envolvido na mudança do formato das plaquetas e ajuda a ampliar as respostas mediadas pelos outros agonistas (KAHNER et al., 2006). A ligação do ADP nos receptores P2Y1 gera a ativação da fosfolipase A2 que ativa a geração de TxA₂. Tanto a ativação dos receptores P2Y1 quanto a ligação do ATP nos receptores P2X (principalmente o P2X1) gera mobilização e influxo de Ca²⁺ e mudança no formato das plaquetas. Todos esses fatores levam à ativação plaquetária e à estabilização de agregados plaquetários já existentes. Estando isso esclarecido, podemos sugerir que os pacientes com CCR envolvidos nesse estudo podem estar suscetíveis a processos trombóticos - fato que comprometeria ainda mais o estado de saúde desses indivíduos.

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

Aliado a isso, a ausência de alteração na atividade da enzima ADA observada no presente

trabalho quando comparado o grupo de pacientes com CCR e o grupo controle também colabora para a manutenção dos níveis séricos de adenosina elevados que, de acordo com o proposto por Spychala e Kitajewski (2004), poderia promover inclusive a resistência do tumor ao tratamento com drogas antineoplásicas.

Complementarmente ao envolvimento dos processos inflamatórios e trombóticos na patogênese das neoplasias, especialmente no CCR - que é o destaque da nossa pesquisa, a ocorrência de estresse oxidativo em pacientes com câncer também é frequentemente relatada.

A literatura descreve que o status antioxidante na mucosa intestinal tumoral é maior em comparação com a mucosa saudável, provavelmente em função do aumento de processos oxidativos nos tecidos doentes (KOCOT et al., 2013). Nesse contexto, as atividades da SOD e da MPO podem fornecer dados indiretos sobre a atividade da doença, representando potenciais biomarcadores diagnósticos no CCR, haja vista a importância do estresse oxidativo no mecanismo fisiopatológico dessa neoplasia (CARINI et al., 2017).

Sobre a MPO, ela pode ser usada como marcador de inflamação na mucosa colorretal, sendo também um importante alvo terapêutico no tratamento de condições inflamatórias que levam ao desenvolvimento do CCR (VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009). Em nosso estudo verificamos uma menor atividade dessa enzima no grupo de pacientes com diagnóstico de CCR e, alinhado a esse resultado, a literatura tem demonstrado que a atividade basal da MPO está envolvida na defesa da mucosa contra tumores (REVAZ; NARDELLI-HAEFLIGER, 2005) e, em modelos animais, a deficiência de MPO resulta no exagero da resposta inflamatória e afeta as funções dos neutrófilos, especialmente no que tange à produção de citocinas (ARATANI, 2018; MARIANI; RONCUCCI, 2017). Sendo assim, podemos sugerir que o controle dos processos inflamatórios da mucosa intestinal dos pacientes que têm baixa atividade da MPO está prejudicado, tornando esses pacientes mais suscetíveis e vulneráveis à progressão do CCR.

A relação entre o desenvolvimento de tumores do cólon e a atividade da MPO abaixo da basal pode estar associada à presença, em demasia, do seu substrato H_2O_2 . Uma vez que uma menor atividade dessa enzima pode levar a uma deficiência da metabolização de H_2O_2 , permitindo o acúmulo desse substrato e facilitando a progressão do CCR (AL-SALIHI; REICHERT; FITZPATRICK, 2015). Tal afirmação é corroborada pelo fato de que o tecido tumoral do cólon produz grandes quantidades de H_2O_2 (ZIŁCZUK et al., 2019) e, nesse contexto, é importante ressaltar que o H_2O_2 é mais prejudicial das EROs devido a sua capacidade de se mover facilmente através dos compartimentos celulares (GAYA-BOVER et al., 2020).

Não bastasse, estudos, em camundongos, com inibição da atividade ou ausência do gene para expressão de MPO, mostraram um aumento pequeno, mas significativo, na incidência de tumores do cólon (AL-SALIHI; REICHERT; FITZPATRICK, 2015) . Ainda, se considerarmos o microambiente tumoral, foi demonstrado, no estudo realizado por Däster e colaboradores (2015), que a baixa expressão de MPO e de células T CD8 + é indicativa de um prognóstico mais severo de CCR. De forma análoga, em outra pesquisa os autores mostraram que uma maior densidade de neutrófilos e outras células que apresentem atividade da MPO, quando associados ao tumor estão relacionadas a um melhor prognóstico e maior sobrevida para a doença (GALDIERO et al., 2016; HIRT et al., 2013).

Neste estudo, foi observado um aumento significativo na atividade da SOD em pacientes com diagnóstico de CCR em comparação com o grupo controle, sugerindo que pode haver uma maior demanda antioxidante na presença do tumor. Uma possível interpretação para este resultado é uma maior atividade enzimática associada a um mecanismo de compensação à maior produção de EROs no ambiente tumoral. Em conformidade com os nossos achados, diversos estudos já descreveram uma maior atividade de SOD em pacientes com CCR quando comparados a indivíduos saudáveis. Os estudos obtidos por Gaya-Bover e colaboradores (2020) e por Kocot e colaboradores (2013) mostraram um aumento da atividade da SOD diretamente no microambiente tumoral, enquanto que os estudos conduzidos pelos grupos de Malinowska (2015) e de Zińczuk (2019) mostraram uma maior atividade da SOD no sangue total, semelhantemente ao que foi encontrado pelo nosso grupo de pesquisa (SKRZYDLEWSKA, 2005; STRZELCZYK et al., 2012; KOCOT et al., 2013; MALINOWSKA et al., 2015; ZIŃCZUK et al., 2019; GAYA-BOVER et al., 2020).

Em contrapartida, há estudos mostrando uma diminuição na atividade da enzima SOD em pacientes com CCR (VAN DRIEL et al., 1997; GOPČEVIĆ et al., 2013). Contudo, sobre esse fato, a literatura aponta para uma variação na atividade e expressão da SOD de acordo com o estadiamento tumoral e isoforma avaliada. Skrzycki e colaboradores (2009) descreveram uma maior concentração de biomarcadores de estresse oxidativo e uma elevação da atividade da SOD1 nos estágios iniciais do desenvolvimento do CCR, cursando com discreta diminuição dessa atividade nos estágios mais avançados da neoplasia. Em relação à SOD2, o mesmo trabalho apresentou um comportamento ondulatório em sua atividade, com diminuição no primeiro e terceiro estágios, e aumento no segundo e quarto estágios, sugerindo uma adaptação do tumor aos níveis elevados de estresse oxidativo (SKRZYCKI et al., 2009).

Além disso, o grupo de pesquisa de Gaya-Bover (2020) mostrou uma elevação progressiva da expressão de SOD que coincidente com o avanço tumoral, apresentando maiores níveis de SOD em estágios mais avançados da doença. Nesse caso, os autores sugerem que esta poderia ser uma resposta ao aumento do estresse oxidativo decorrente de maior hipóxia tecidual nos estágios mais avançados da neoplasia, fato que poderia sugerir que os pacientes envolvidos no nosso estudo apresentam tumores em estágios avançados de desenvolvimento. Além disso, o mesmo estudo encontrou níveis elevados de SOD, CAT e glutathione peroxidase (GPx) em tecidos não tumorais de pacientes com CCR nos estágios II e III em comparação com o tecido não tumoral de pacientes no estadios I, sugerindo, assim, uma adaptação ao estresse oxidativo não apenas no tecido tumoral como também nos tecidos vizinhos.

Importante de ser destacado, nesse ponto, é que a maior atividade da SOD pode estar associada também a mecanismos de resistência das células tumorais aos efeitos danosos das EROs. Os efeitos tóxicos do estresse oxidativo, observados no contexto do CCR, podem ser minimizados pelas células neoplásicas através da super ativação da SOD, uma vez que a MnSOD (Superóxido dismutase dependente de Manganês) também protege as células tumorais contra efeitos citotóxicos (KOCOT et al., 2013). É descrito na literatura, inclusive, um envolvimento do mRNA de MnSOD na invasão vascular em diversos tipos de câncer, inclusive no CCR (MIAR et al., 2015; LI et al., 2018). Nesse contexto, os pacientes do nosso estudo podem estar desenvolvendo mecanismos alternativos para a maior sobrevivência e resistência das células tumorais àquele microambiente, especialmente pelo aumento da atividade da SOD.

Ademais, foi demonstrado que o tecido tumoral do cólon produz grandes quantidades de H_2O_2 - produto da atividade de SOD (ZIŃCZUK et al., 2019), o que pode colaborar para a progressão tumoral. Sua inibição tem sido inclusive estudada como potencial alvo terapêutico (AZZOLIN et al., 2016). Dessa forma, uma maior atividade de SOD no tecido tumoral pode indicar também um fator vantajoso para o desenvolvimento da neoplasia.

Muitas evidências defendem o fato que moléculas antioxidantes, como tióis (T-SH e NPSH) e VIT C agem como “supressores tumorais”, neutralizando o excesso de EROs (ZANINI, 2014). Graus moderados e elevados de espécies reativas agem como promotoras de malignidade e os antioxidantes podem impedir a promoção e a progressão tumoral (LIU et al., 2017). Com base na literatura, níveis séricos desses antioxidantes podem apresentar variáveis, dependendo de fatores, como: estadiamento da doença, possibilidade de resposta tumoral aos quimioterápicos e fatores alimentares.

O potencial antioxidante dos compostos sulfidrílicos pode ocorrer direta ou indiretamente. De forma direta, a atividade antioxidante dessas moléculas está relacionada à presença do próprio grupamento -SH, que denomina esse grupo de substâncias e que tem a capacidade de acomodar elétrons desemparelhados, diminuindo a reatividade de inúmeras moléculas potencialmente perigosas ao organismo. Por outro lado, de modo indireto, os compostos tiólicos atuam como substratos de importantes enzimas antioxidantes como, por exemplo, da Glutathione S-Transferase (GST), sendo fundamentais, portanto, para o controle dos eventos oxidativos (MASELLA et al., 2005). Desse modo, é inegável a importância biológica que os compostos sulfidrílicos apresentam no controle da produção excessiva de EROs que é observada durante a carcinogênese.

Nossos estudos demonstraram um aumento significativo dos níveis séricos de NPSH em pacientes com CCR. A literatura têm reforçado que quando os há um aumento de tióis séricos em pacientes oncológicos, esse achado pode estar correlacionado com um maior grau de estadiamento tumoral e com um pior prognóstico, (BULBULLER et al., 2013; ZANINI, 2014). Mesmo ainda sendo contraditória a associação dos níveis séricos de tióis no prognóstico do CCR, a teoria mais difundida, atualmente, correlaciona altos níveis de grupamentos -SH a tumores com menor resposta a quimioterápicos, sendo tal ocorrência relacionada com o aumento dos níveis de NPSH, principalmente a GSH (ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006; ZANINI, 2014).

Ainda, estudos indicam que menores níveis de GSH induzem melhores respostas aos fármacos antineoplásicos, pois o efeito antitumoral dessas drogas depende, amplamente, da depleção dos níveis de glutathione, que em altos títulos pode atuar como protetora tumoral (ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006; ZANINI, 2014). Por isso, considerando que os níveis de glutathione dos pacientes envolvidos nesta pesquisa estão elevados, esses pacientes oncológicos podem exibir uma resistência ao tratamento quimioterápico, exibindo pior prognóstico.

Além da ação dos compostos tiólicos no combate do estresse oxidativo em pacientes oncológicos, o potencial antioxidante da VIT C também precisa ser destacado. Quando um radical livre libera ou furta elétrons, um segundo radical é formado, gerando reações em cadeia que favorecem a superprodução de espécies reativas. A VIT C, por sua vez, age por meio da chamada ação chain-breaking, interrompendo essa sequência de eventos, através da estabilização de radicais livres (GUPTA et al., 2014; GILLBERG et al., 2018).

Os indivíduos com diagnóstico de CCR, investigados em nosso estudo, apresentaram níveis de VIT C semelhantes aos dos indivíduos saudáveis, fato que pode ter correlação com a dieta dos pacientes, visto que o consumo de frutas cítricas é comum em nossa região. Um estudo

recente, desenvolvido por Nesi e colaboradores (2019), mostrou que 70% das famílias do oeste catarinense possuía uma plantação de pelo menos uma fruta cítrica para consumo doméstico e esse hábito pode atuar como fator preventivo à depleção de VIT C.

O aumento da ingestão de VIT C pode prevenir a diminuição dos níveis séricos desse antioxidante pela ação das EROs, sendo importante para uma potencial redução da mortalidade, por diversos tipos de cânceres, incluindo o CCR, além de apresentar fatores protetivos contra sua gênese e desenvolvimento (CHAMBIAL et al., 2013). Em meta-análise feita por HARRIS, ORSINI e WOLK, no ano de 2014, foi observado que o aumento do consumo de VIT C após o diagnóstico de câncer de mama diminuiu o risco de mortalidade entre as pacientes, mostrando o valor de sua suplementação.

Além disso, segundo Gillberg e colaboradores (2017), a deficiência de VIT C é um achado comum em pacientes portadores de qualquer tipo de neoplasia, podendo ser ainda maior em pacientes com cânceres agressivos. Uma das explicações para essa constatação é o fato de que células cancerígenas induzem o estresse oxidativo e a formação de EROs, e a liberação de radicais livres aumenta o consumo de vitamina C, já que esse composto possui importante ação antioxidante.

Ante o exposto, é possível evidenciar que os resultados obtidos através das análises realizadas endossam os argumentos literários em relação aos níveis séricos dessas moléculas antioxidantes em pacientes com diagnóstico de CCR. A importância dos compostos tiólicos e da VIT C no controle das inúmeras etapas do processo carcinogênico e, inclusive, na proposição de protocolos terapêuticos exitosos revelam a necessidade de aprofundar os conhecimentos acerca desses parâmetros bioquímicos, a fim de que condutas clínicas precisas e satisfatórias sejam adotadas no que se refere aos pacientes oncológicos.

A análise desses resultados, em conjunto, apresenta grande relevância para o contexto médico e de saúde pública, visto que medidas preventivas e paliativas podem ser adotadas de maneiras mais eficientes, a fim de que os pacientes com diagnóstico de CCR possam apresentar uma melhor qualidade de vida e um prolongamento da sobrevida.

9 CONCLUSÕES

A partir deste estudo espera-se contribuir e incentivar novas pesquisas englobando a sinalização purinérgica e o estresse oxidativo na patologia do CCR. Além disso, é importante ressaltar a sustentabilidade dos resultados uma vez que foram analisados diretamente em pacientes com a neoplasia. Ademais, esta pesquisa favorece a consolidação desta área de estudo e o progresso científico, elucidando a relação entre o câncer, o sistema purinérgico e o estresse oxidativo. Até o momento, é possível inferir que a atividade das ectonucleotidases em plaquetas é distinta em pacientes com CCR quando comparados com indivíduos saudáveis, o que pode estar contribuindo para a progressão tumoral.

REFERÊNCIAS

- ABAR, L. et al. Height and Body Fatness and Colorectal Cancer Risk: An Update of the WCRF-AICR Systematic Review of Published Prospective Studies. **European Journal of Nutrition**, 28 de outubro de 2017.
- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 64, n. 3, p. 445–475, 1994.
- ABBRACCHIO, Maria P.; BURNSTOCK, Geoffrey. Sinalização purinérgica: papéis fisiopatológicos. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 78, n. 2, pág. 113-145, 1998.
- ADINOLFI, Elena et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. **Cancer research**, v. 72, n. 12, p. 2957-2969, 2012.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: **American Cancer Society**, 2019.
- ALLARD, Bertrand et al. The ectonucleotidases CD 39 and CD 73: novel checkpoint inhibitor targets. **Immunological reviews**, v. 276, n. 1, p. 121-144, 2017.
- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 637-648, 1992.
- AL-SALIHI, Mazin; REICHERT, Ethan; FITZPATRICK, F. A. Influence of myeloperoxidase on colon tumor occurrence in inflamed versus non-inflamed colons of ApcMin/+ mice. **Redox biology**, v. 6, p. 218-225, 2015.
- ALMEIDA, Mariana Mandelli de. **Determinação e quantificação das vitaminas C e E associadas em produtos cosméticos**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ARDIES, C. Murray. Inflammation as cause for scar cancers of the lung. **Integrative Cancer Therapies**, v. 2, n. 3, p. 238-246, 2003.
- ARAUJO, Sergio Eduardo Alonso; ALVES, Paulo Roberto Arruda; HABR-GAMA, Angelita. Papel da colonoscopia no câncer colorretal. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 56, n. 1, p. 25-35, 2001.
- ARAÚJO, M. C.; ROCHA, J. B. T.; MORSCH, A. Enzymes that hydrolyze nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1740; p. 421– 426, 2005.
- ARATANI, Yasuaki. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 640, p. 47-52, 2018.
- ARNOLD, Melina et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683-691, 2017.
- AZZOLIN, Verônica Farina et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. **Toxicology in vitro**, v. 32,

p. 8-15, 2016.

BAKAN, Nuri et al. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu–Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. **Clinica chimica acta**, v. 338, n. 1-2, p. 143-149, 2003.

BATTISTI, Vanessa et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 3, p. 203-208, 2013.

BELLEFEUILLE, Steve Dagenais; MOLLE, Caroline M.; GENDRON, Fernand-Pierre. Reviewing the role of P2Y receptors in specific gastrointestinal cancers. **Purinergic signalling**, v. 15, n. 4, p. 451-463, 2019.

BONNEFOY, Marc; DRAI, Jocelyne; KOSTKA, Tomasz. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Medicale** (Paris, France: 1983), v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAY, Freddie et al. Estatísticas globais de câncer de 2018: estimativas GLOBOCAN de incidência e mortalidade mundial para 36 cânceres em 185 países. **CA cancer: uma revista sobre câncer para médicos**, v. 68, n. 6, pág. 394-424, 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. Subsecretaria de Planejamento e Orçamento. Plano Nacional de Saúde. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2016. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_nacional_saude_2016_2019_30032015_final.pdf> Acesso em: 10 Mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de Câncer- Câncer de Intestino. Rio de Janeiro: **Ministério da Saúde**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>> Acesso em: 10 jan. 2021.

BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina et al. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **The American journal of clinical nutrition**, v. 76, n. 4, p. 703-716, 2002.

BRUNI, Daniela; ANGELL, Helen K.; GALON, Jérôme. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 11, p. 662-680, 2020.

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BOSMAN, F. T. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: Classification of tumours of the digestive system. 4. ed. Lyon: International Agency for **Research on Cancer**, 2010.

BULBULLER, N. et al. Diagnostic value of thiols, paraoxonase 1, arylesterase and oxidative balance in colorectal cancer in human. **Neoplasma**, v. 60, n. 4, p. 419-424, 2013.

- BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacolo. Rev.**, v. 24, p. 509–581, 1972.
- BURNSTOCK, Geoffrey. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. **Lancet** (London, England), v. 347, n. 9015, p. 1604-1605, 1996.
- BURNSTOCK, G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1127-1139, 1997.
- BURNSTOCK, Geoffrey. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends in pharmacological sciences**, v. 27, n. 3, p. 166-176, 2006.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007.
- BURNSTOCK, Geoffrey; DI VIRGILIO, Francesco. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic signalling**, v. 9, n. 4, p. 491-540, 2013.
- BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signalling: therapeutic developments. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 661, 2017.
- CALIK, Ilknur et al. A promising independent prognostic biomarker in colorectal cancer: P2X7 receptor. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 13, n. 2, p. 107, 2020.
- CARINI, Francesco et al. Colorectal carcinogenesis: Role of oxidative stress and antioxidants. **Anticancer research**, v. 37, n. 9, p. 4759-4766, 2017.
- CONCEIÇÃO, Kelson Nascimento et al. Poder antioxidante de carotenoides, flavonoides e vitamina e na prevenção da arteriosclerose. **Revista Ciência & Saberes-UniFacema**, v. 2, n. 4, p. 320-324, 2017.
- COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflamação e câncer. **Nature**, v. 420, n. 6917, pág. 860-867, 2002.
- COOK, John A. et al. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. In: **Seminars in radiation oncology**. WB Saunders, 2004. p. 259-266.
- CHAMBIAL, Shailja et al. Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. **Indian journal of clinical biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 314-328, 2013.
- CHOWDHURY, Mohammad A. et al. Effects of differentiation on purinergic and neurotensin-mediated calcium signaling in human HT-29 colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, n. 1, p. 35-39, 2013.
- DANTAS, Élide Livia Rafael et al. Genética do câncer hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2009.
- DA SILVA, Márcio; ERRANTE, Paolo Ruggero. Câncer colorretal: fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, n. 33, p. 133-140, 2017.
- DASH, Chiranjeev et al. Oxidative balance scores and risk of incident colorectal cancer in a US

prospective cohort study. **American journal of epidemiology**, v. 181, n. 8, p. 584-594, 2015.

DÄSTER, S. et al. Absence of myeloperoxidase and CD8 positive cells in colorectal cancer infiltrates identifies patients with severe prognosis. **Oncoimmunology**, [s.l.], v. 4, n. 12, p.1-8, 29 maio 2015.

DE LEON, M. Ponz; DI GREGORIO, C. Pathology of colorectal cancer. **Digestive and Liver Disease**, v. 33, n. 4, p. 372-388, 2001.

DEAGLIO, Silvia; ROBSON, Simon C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. **Advances in pharmacology**, v. 61, p. 301-332, 2011.

DI VIRGILIO, Francesco et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 97, n. 3, p. 587-600, 2001.

DI VIRGILIO, Francesco. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer research**, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 2012.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 191, p. 117-123, 2015.

DI VIRGILIO, Francesco et al. P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading. **Current opinion in pharmacology**, v. 29, p. 17-25, 2016.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, p. 1-11, 2017.

DI VIRGILIO, Francesco et al. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 10, p. 601-618, 2018

DI VIRGILIO, Francesco et al. Structure, function and techniques of investigation of the P2X7 receptor (P2X7R) in mammalian cells. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press. p. 115-150, 2019.

DOS SANTOS, Wellington et al. Mutation profiling of cancer drivers in Brazilian colorectal cancer. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

DOU, Lei et al. Extracellular ATP signaling and clinical relevance. **Clinical Immunology**, v. 188, p. 67-73, 2018.

DROESER, Raoul A. et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. **European journal of cancer**, v. 49, n. 9, p. 2233-2242, 2013.

ELLMAN, G. L. A. Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptans; **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.74 p. 443-450, 1958.

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

ESTRELA, José M.; ORTEGA, Angel; OBRADOR, Elena. Glutathione in cancer biology and

therapy. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 43, n. 2, p. 143-181, 2006.

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

FEDERICO, Alessandro et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **International journal of cancer**, v. 121, n. 11, p. 2381-2386, 2007.

FENG, Lili et al. Purinegic Modulation and CD39/ENTPD1 in Cancer. **Frontiers in Anti-Cancer Drug Discovery, Bentham Science Publishers**, Beijing, China, p. 229-292, 2014.

FEY, A. et al. Perfil epidemiológico e evolução dos pacientes com câncer de cólon e reto atendidos no Hospital Regional Alto Vale no ano de 2008. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 39, n. 4, p. 62-67, 2010.

FERRARI, Davide; MALAVASI, Fabio; ANTONIOLI, Luca. A purinergic trail for metastases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 3, p. 277-290, 2017.

FREITAS, Bianca Astrogildo de et al. OBESIDADE E DESENVOLVIMENTO DE ADENOMA ESTÃO ASSOCIADOS COMO PRECURSORES DO CÂNCER COLORRETAL?. ABCD. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 33, 2020.

FÜRSTENAU, C. R.; TRENTIN, D. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. M; SARKIS, J. J. F. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: **kinetic characterization and biochemical properties. Platelets**, v. 17; p. 84-91, 2006.

GAO, Zhan-Guo; JACOBSON, Kenneth A. A2B adenosine receptor and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 5139, 2019.

GALDIERO, Maria Rosaria et al. Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 2, p. 446-456, 2016.

GASPAR, Alexandra; SILVA, Tiago; BORGES, Fernanda. Adenosine A3 receptors: a new therapeutic approach in cancer. **Química Nova**, v. 34, p. 1417-1424, 2011.

GAYA-BOVER, Auba et al. Antioxidant enzymes change in different non-metastatic stages in tumoral and peritumoral tissues of colorectal cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 120, p. 105698, 2020.

GESSI, S. et al. Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 17, p. 5895-5901, 2004.

GESSI, Stefania et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of cellular physiology**, v. 211, n. 3, p. 826-836, 2007.

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

3, p. 227-234, 2005.

GOTO, Hiroaki et al. Lack of mitochondrial depolarization by oxidative stress is associated with resistance to buthionine sulfoximine in acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia research**, v. 31, n. 9, p. 1293-1301, 2007.

GOPČEVIĆ, Kristina R. et al. Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in different stages of colorectal carcinoma. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 9, p. 2646-2652, 2013.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Methods of enzymatic analysis. Weinheim: **Verlag Chemie**, 1984.

GILLBERG, Linn et al. Vitamin C–A new player in regulation of the cancer epigenome. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, p. 59-67, 2018.

GRANER, Michael W. Extracellular vesicles in cancer immune responses: roles of purinergic receptors. In: **Seminars in Immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 465-475. 2018.

GUPTA, Rakesh Kumar et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 15, n. 11, p. 4405-4409, 2014.

HABIG, W. H. et al. Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Arch Biochem Biophys*. v.175, ed. 2, p.710-716, 1976.

HADJIPETROU, A. et al. Colorectal cancer, screening and primary care: A mini literature review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 33, p. 6049–6058,. 2017.

HANSEN, L. G.; WARWICK, W. J. A fluorometric micro method for fat tocopherol. **Clinical Biochemistry**, v. 3, p. 225-229, 1970.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. Free radicals in biology and medicine. **Oxford university press**, USA, 2015.

HASKO, Gyorgy et al. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 10, p. 4634-4640, 1996.

HARRIS, Holly R.; ORSINI, Nicola; WOLK, Alicja. Vitamin C and survival among women with breast cancer: a meta-analysis. *European journal of cancer*, v. 50, n. 7, p. 1223-1231, 2014.

HAO, Minglu; LIU, Rutao. Molecular mechanism of CAT and SOD activity change under MPA-CdTe quantum dots induced oxidative stress in the mouse primary hepatocytes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 220, p. 117104, 2019.

HE, Jin; EFRON, Jonathan E. Screening for colorectal cancer. **Advances in surgery**, v. 45, p. 31-44, 2011.

HIRT, Christian et al. Colorectal carcinoma infiltration by myeloperoxidase-expressing neutrophil granulocytes is associated with favorable prognosis. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 10, p. e25990,

2013.

HOFMAN, Paul et al. Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cancer research**, v. 75, n. 5, p. 835-845, 2015.

HÖPFNER, M. et al. Expression of functional P2-purinergic receptors in primary cultures of human colorectal carcinoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 251, n. 3, p. 811-817, 1998.

HUGEN, N. et al. Colorectal signet-ring cell carcinoma: benefit from adjuvant chemotherapy but a poor prognostic factor. **Int J Cancer**, v. 136, n. 2, p. 333-339, 2015.

INCA. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil. 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-decancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2020

IDZKO, Marco et al. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 124, n. 7, p. 1029-1037, 2014.

JACQUES-SILVA, Maria Caroline et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology & toxicology**, v. 88, n. 3, p. 119-125, 2001.

JENTZSCH, Axel M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 2, p. 251-256, 1996.

KAHNER, B. N. et al. Nucleotide receptor signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 11, p. 2317-2326, 2006.

KARIMI, Mehran; COHAN, Nader. Cancer-associated thrombosis. **The open cardiovascular medicine journal**, v. 4, p. 78, 2010.

KERR, J.; ANDERSON, C.; LIPPMAN, S. M. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 8, p. e457–e471, 2017.

KEUM, NaNa; GIOVANNUCCI, Edward. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713-732, 2019.

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

KOCOT, Joanna et al. Total antioxidant status value and superoxide dismutase activity in human colorectal cancer tissue depending on the stage of the disease: a pilot study. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 22, n. 3, p. 431-437, 2013.

KUNZLI, B. M. et al. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of

colorectal cancer. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 2, p. 231-241, jun. 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins, Basic Pathology. 10. ed. Philadelphia: **Elsevier**, 2018.

LAMBERT, Arthur W.; PATTABIRAMAN, Diwakar R.; WEINBERG, Robert A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017.

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

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

LEAL, D.B. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1721, p.9-15, 2005.

LEBEL, Carl P.; ISCHIROPOULOS, Harry; BONDY, Stephen C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

LICHTENSTEIN, Paul et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 2, p. 78-85, 2000.

LI, Qi et al. Anagliptin inhibits neointimal hyperplasia after balloon injury via endothelial cell-specific modulation of SOD-1/RhoA/JNK signaling in the arterial wall. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 121, p. 105-116, 2018.

LÓPEZ, Pedro J. Tárraga; ALBERO, Juan Solera; RODRÍGUEZ-MONTES, José Antonio. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. **Clinical Medicine Insights: Gastroenterology**, v. 7, p. CGast. S14039, 2014

LUNKES, G.I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb Res**, v. 15, n. 109, p. 189-94, 2003.

LUNKES, Gilberto Inácio et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. **Diabetes research and clinical practice**, v. 81, n. 3, p. 351-357, 2008.

LIU, Hao et al. Redox imbalance in the development of colorectal cancer. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 9, p. 1586, 2017.

MALDONADO, Paula Acosta et al. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. **Clinica chimica acta**, v. 366, n. 1-2, p. 174-178, 2006.

MALDONADO, Paula Acosta et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 400-406, 2008.

MALDONADO, Paula Acosta et al. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine

cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 7, p. 499-504, 2010.

MALINOWSKA, Katarzyna et al. Evaluation of antioxidant defense in patients with colorectal carcinoma. **Polish Journal of Surgery**, v. 7, n. 87, p. 357-361, 2015.

MARIANI, F.; SENA, P.; RONCUCCI, L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 29, p. 9716–9731, 7 ago. 2014.

MARTINS, Caroline Curry et al. Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients. **Clinica chimica acta**, v. 454, p. 66-71, 2016.

MASELLA, Roberta et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

MASUTANI, Hiroshi. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. **International journal of hematology**, v. 71, n. 1, p. 25-32, 2000.

MASSÉ, Karine et al. Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 1, p. 181-193, 2009.

MATTIUZZI, Camilla; LIPPI, Giuseppe. Carga epidemiológica da ingestão de carne vermelha e processada na mortalidade por câncer colorretal. **Nutrição e câncer**, v. 73, n. 4, pág. 562-567, 2021.

MERIGHI, Stefania et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 100, n. 1, p. 31-48, 2003.

MCCORD, Joe M.; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969

MIAO, Lu; CLAIR, Daret K. St. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 344-356, 2009.

MOESTA, Achim K.; LI, Xian-Yang; SMYTH, Mark J. Targeting CD39 in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 12, p. 739-755, 2020.

MORIWAKI, Yuji; YAMAMOTO, T.; HIGASHINO, K. Enzymes involved in purine metabolism-a review of histochemical localization and functional implications. **Histology and histopathology**, v. 14, n. 4, p. 1321-1340, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2018.

MIAR, Ana et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. **Free**

Radical Biology and Medicine, v. 85, p. 45-55, 2015.

NELSON, Dennis P.; KIESOW, Lutz A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

NESI, CRISTIANO NUNES; DORIGON, Clóvis; PIEREZAN, Seliane. Produção de frutas para autoconsumo na região Oeste Catarinense. **FRUSUL-Simpósio de Fruticultura da Região Sul**, v. 2, n. 1, 2019.

OLIVEIRA, Renata Barbosa de; ALVES, Ricardo José. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química nova**, v. 25, p. 976-984, 2002.

OCHOA-CORTES, F. et al. Potential for developing purinergic drugs for gastrointestinal diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1259–1287, 2014.

OHTA, Akio et al. A_{2A} adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5487-5493, 2009.

ØINES, M. et al. Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 31, n. 4, p. 419–424, ago. 2017.

PACHECO-PÉREZ, Luis Arturo et al. Fatores ambientais e consciência do câncer colorretal em pessoas em risco familiar. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 27, 2019.

PASTOR, Tatiane de Pinho. Variantes de seqüência no gene MSH2 em pacientes selecionados para a Síndrome de Lynch. 2014.

PELLEGATTI, Patrizia et al. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. **PloS one**, v. 3, n. 7, p. e2599, 2008.

PERŠE, Martina. Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence?. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

PELEGRIN, Pablo; SURPRENANT, Annmarie. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphatase. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 14, p. 2114-2127, 2009.

PFAFFENZELLER, Marta Schmidt; FRANCIOSI, Maria Luiza Mukai; CARDOSO, Andréia Machado. Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical Cancer. **Purinergic Signalling**, v. 16, n. 1, p. 123-135, 2020.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225-230, 1996.

POTTER, John D. Colorectal cancer: molecules and populations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 11, p. 916-932, 1999.

QIAN, Fei et al. High expression of P2X₇R is an independent postoperative indicator of poor

prognosis in colorectal cancer. **Human pathology**, v. 64, p. 61-68, 2017.

RALEVIC, Vera; BURNSTOCK, Geoffrey. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

RATHBONE, Michel P. et al. Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 28, n. 7, p. 529-536, 1992.

REVAZ, Véronique; NARDELLI-HAEFLIGER, Denise. The importance of mucosal immunity in defense against epithelial cancers. **Current opinion in immunology**, v. 17, n. 2, p. 175-179, 2005.

REGATEIRO, Frederico S.; COBBOLD, Stephen P.; WALDMANN, Herman. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 171, n. 1, p. 1-7, 2013

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

RONCUCCI, Luca; PEDRONI, Monica; MARIANI, Francesco. Attenuated adenomatous polyposis of the large bowel: Present and future. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 23, p. 4135, 2017.

SCHMATZ, Roberta et al. Efeitos do resveratrol, do suco de uva e do vinho tinto nos biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade de ectoenzimas em ratos diabéticos. 2012. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Maria.

SCHERER, R., et al. Effect of Slaughter Method on Postmortem Changes of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Stored in Ice. **Journal of Food Science**. v. 70, n. 5, p. 348-353, 2005.

SEK, Kevin et al. Targeting adenosine receptor signaling in cancer immunotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 3837, 2018.

SHAW, Eileen et al. Effects of physical activity on colorectal cancer risk among family history and body mass index subgroups: a systematic review and meta-analysis. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2018.

SHIA, Jinru et al. TNM staging of colorectal carcinoma: issues and caveats. In: **Seminars in diagnostic pathology**. WB Saunders, 2012. p. 142-153.

SONG, Mingyang; GARRETT, Wendy S.; CHAN, Andrew T. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1244-1260. e16, 2015.

SONG, Mingyang; CHAN, Andrew T.; SUN, Jun. Influence of the gut microbiome, diet, and environment on risk of colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 158, n. 2, p. 322-340, 2020.

SOUZA, V. DO C. G. et al. Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 4, p.

753–762, 2012.

SOUZA, Viviane do Carmo Gonçalves et al. Evaluation of P2X7 receptor expression in peripheral lymphocytes and immune profile from patients with indeterminate form of Chagas disease. **Microbial pathogenesis**, v. 104, p. 32-38, 2017.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SPYCHALA, Jozef. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & therapeutics**, v. 87, n. 2-3, p. 161-173, 2000.

SPYCHALA, Jozef; KITAJEWSKI, Jan. Wnt and β -catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. **Experimental cell research**, v. 296, n. 2, p. 99-108, 2004.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 39, p. 5346-5358, 2010.

STEGNER, David; DÜTTING, Sebastian; NIESWANDT, Bernhard. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. **Thrombosis research**, v. 133, p. S149-S157, 2014.

SKRZYCKI, Michał et al. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. **Acta biochimica polonica**, v. 56, n. 4, 2009.

SKRZYDLEWSKA, Elzbieta et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 11, n. 3, p. 403, 2005.

STRZELCZYK, Joanna Katarzyna et al. The activity of antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma and corresponding normal mucosa. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 4, 2012.

TALMADGE, James E .; FIDLER, Isaiah J. AACR Série centenária: a biologia da metástase do câncer: perspectiva histórica. **Pesquisa do câncer** , v. 70, n. 14, pág. 5649-5669, 2010.

TANIYAMA, Yoshihiro; GRIENDLING, Kathy K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075-1081, 2003.

TAKENAKA, Maisa C.; ROBSON, Simon; QUINTANA, Francisco J. Regulation of the T cell response by CD39. **Trends in immunology**, v. 37, n. 7, p. 427-439, 2016.

TOYOKUNI, Shinya et al. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS letters**, v. 358, n. 1, p. 1-3, 1995.

VANHAMME, Luc et al. The other myeloperoxidase: Emerging functions. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 649, p. 1-14, 2018.

VAN DER VEEN, Betty S.; DE WINTHER, Menno PJ; HEERINGA, Peter. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 11, p. 2899-2937, 2009.

VAN DRIEL, Bernard EM et al. Expression of CuZn-and Mn-superoxide dismutase in human colorectal neoplasms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 3, p. 435-444, 1997.

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

VIGANO, Selena et al. Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-cell function. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 925, 2019.

WAN, H. et al. Important roles of P2Y receptors in the inflammation and cancer of digestive system. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 28736-28747, 2016.

WINAWER, Sidney J. et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 56, n. 3, p. 143-159, 2006.

WU, Feng et al. Activated anti-tumor immunity in cancer patients after high intensity focused ultrasound ablation. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 30, n. 9, p. 1217-1222, 2004.

YAGUCHI, Takahiro et al. Higher concentrations of extracellular ATP suppress proliferation of Caco-2 human colonic cancer cells via an unknown receptor involving PKC inhibition. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 125-134, 2010.

YEGUTKIN, Gennady G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.

YU, Hwei-Ju Annie et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. **Cancer treatment reviews**, v. 29, n. 6, p. 461-470, 2003.

ZANDONAI, Alexandra Paola; SONOBE, Helena Megumi; SAWADA, Namie Okino. Factores de riesgo alimentario para câncer colorrectal relacionado al consumo de carnes. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 1, p. 234-239, 2012.

ZHANG, Xia; GONCALVES, Ricardo; MOSSER, David M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Current protocols in immunology**, v. 83, n. 1, p. 14.1. 1-14.1. 14, 2008.

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomed Pharmacother**, v. 66, n. 1, p. 40-45, 2012.

ZANINI, D. et al. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Mol Cell Biochem**, v. 374, n. 1-2, p. 137-148, 2013.

ZANINI, D. Atividade de ectoenzimas do sistema purinérgico e análise de biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com câncer de pulmão. 2014. (Tese Doutorado em Bioquímica Toxicológica) – **Centro de Ciências Naturais e Exatas**, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.

ZANINI, Daniela et al. ADA activity is decreased in lymphocytes from patients with advanced

stage of lung cancer. **Medical Oncology**, v. 36, n. 9, p. 1-8, 2019.

ZHAN Gang, Ying; DING, Jingjing; WANG, Lili. O papel do receptor P2X7 no prognóstico e metástase do câncer colorretal. **Avanços nas ciências médicas**, v. 64, n. 2, pág. 388-394, 2019.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 214, n. 2, p. 161-178, 2008.

ZIMMERMANN, Herbert. 5'-Nucleotidase: estrutura molecular e aspectos funcionais. **Biochemical Journal**, v. 285, n. Pt 2, pág. 345, 1992.

ZIMMERMANN, Herbert. Ectonucleotidases no sistema nervoso. In: Purinergic Signaling in Neuron-Glia Interactions: Novartis Foundation Symposium 276. Chichester, Reino Unido: **John Wiley & Sons, Ltd**, p. 113-130, 2006.

ZIŃCZUK, Justyna et al. Antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to biomolecules in patients with colorectal cancer. Can malondialdehyde and catalase be markers of colorectal cancer advancement?. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 637, 2019.

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFFS

Prezado (a) participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: Avaliação da atividade e expressão de componentes do Sistema Purinérgico em plaquetas e linfócitos de pacientes com câncer colorretal esporádico, desenvolvida por discentes e docentes do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó – SC, sob coordenação da Professora Dra. Sarah F. V. O. Maciel.

1. Objetivo Central

Avaliar a atividade e expressão de componentes do Sistema Purinérgico, como enzimas e receptores, em plaquetas e linfócitos de pacientes com câncer colorretal esporádico, de modo a compreender mais profundamente as alterações fisiológicas desencadeadas pelo câncer nesses pacientes.

2. Critério de Inclusão

Pacientes: voluntários entre dezoito (18) e setenta (70) anos de idade que tenham sido diagnosticados com câncer colorretal esporádico (sem origem familiar) por coloproctologista ou oncologista, conforme CID 10, e que não tenham realizado a remoção do tumor ou iniciado tratamento farmacológico. Controles: voluntários entre dezoito (18) e setenta (70) anos de idade que não possuam patologias ativas ou crônicas. Sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se deseja ou não participar, além de poder desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de explicação. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa. Você não receberá remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa.

3. Mecanismos para garantir o sigilo e privacidade

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa. A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar aos pesquisadores informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo.

4. Identificação do participante ao longo do trabalho

Seu nome não será mencionado durante qualquer etapa desta pesquisa, bem como em quaisquer publicações, cursos, relatórios e afins. Apenas o nome da Instituição será mencionado. Para manter o seu anonimato, será utilizada uma codificação numérica. Cada participante terá um número distinto.

5. Tempo de duração da coleta/procedimento/experimento

A sua participação na pesquisa consistirá em consentir na disponibilização dos prontuários médicos (idade, sexo, subtipo patológico do tumor, estadiamento, etc) aos pesquisadores, no fornecimento de 30 ml de sangue total, cujas amostras serão congeladas para posteriores análises, e em responder aos questionários de qualidade de vida. As coletas serão realizadas pelos pesquisadores responsáveis, em ambiente adequado. O tempo de duração da entrevista e da coleta

de sangue será de no máximo uma (1) hora.

6. Guarda dos dados e materiais coletados na pesquisa

As amostras e demais materiais coletados durante a pesquisa serão mantidos em arquivo, físico ou digital, por um período de cinco (5) anos. Apenas os pesquisadores e a orientadora terão acesso às amostras e demais dados. O material coletado será armazenado em armário com cadeado, na sala da pesquisadora, na UFFS. Após o período de cinco anos, todos os arquivos armazenados (físico ou digital) serão destruídos/deletados.

7. Benefícios diretos (individuais ou coletivos) aos participantes da pesquisa

O benefício relacionado com a sua colaboração nessa pesquisa é o aprofundamento dos conhecimentos sobre a ação do Sistema Purinérgico no contexto do câncer colorretal esporádico. Dessa forma, torna-se possível progredir nos aspectos relacionados ao tratamento e, conseqüentemente, prognóstico da condição.

8. Previsão de riscos ou desconfortos

A participação na pesquisa poderá causar riscos. Um risco previsível neste caso é o desconforto no momento da coleta de sangue, em decorrência da picada da agulha. O risco será minimizado, pois a coleta será realizada por profissionais capacitados, visando a segurança dos participantes. Os pesquisadores explicarão detalhadamente o conteúdo da pesquisa e advertirão os participantes de que sua participação não é necessária caso não sintam-se confortáveis para tal. Caso os riscos previstos ocorram, você receberá tratamento e acompanhamento até que esses desconfortos desapareçam. Por exemplo, caso haja hematoma no local da coleta de sangue, você será acompanhado até que esse hematoma desapareça.

9. Divulgação dos resultados da pesquisa

A devolutiva dos resultados obtidos na pesquisa será realizada por meio de publicações científicas e participação em eventos científicos da área, com palestras e com o uso de poster e banner ou informativos online. Os dados pessoais dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Caso concorde em participar, concedendo amostra de sangue, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Não receberá cópia deste termo, mas apenas uma via.

Desde já agradecemos sua participação!

Chapecó – SC, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Pesquisador Responsável

Contato profissional com o(a) pesquisador(a) responsável: Tel: 49-30254508/ e-mail:

sarah.maciел@uffs.edu.br. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS: Tel e Fax - 49- 2049-3745/ E-Mail: cep.uffs@uffs.edu.br.

Endereço para correspondência: Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, Universidade Federal da Fronteira Sul, Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, CEP 89815-899, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome completo do participante _____

Assinatura _____

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA (SF-36)

Adaptado do questionário para adultos da pesquisa EpiFloripa, versão 2014

NOME COMPLETO: _____

DATA: _____

VOU FAZER ALGUMAS PERGUNTAS SOBRE O (A) SR. (A), SUA FAMÍLIA E SUA CASA

3. Quantos anos o (a) Sr. (a) tem? (Marcar os anos completos)

Idade __ __ (1) Não informou

4. Qual sua data de nascimento?

Dia |__ __| Mês |__ __| Ano |__ __ __ __|

(1) IGN

5. O (A) Sr. (a) considera a sua cor da pele:

(1) Branca

(2) Parda

(3) Negra ou preta

(4) Amarela

(5) Indígena

(6) IGN

6. Quantas pessoas no total, contando com o Sr. (a), moram na sua casa?

Número de pessoas |__ __|

(1) IGN

7. Até que série/ano o (a) Sr. (a) completou na escola? (Marcar série/ano de estudo completo)

(1) Ensino fundamental incompleto

(2) Ensino fundamental completo

(3) Ensino Médio Incompleto

(4) Ensino Médio Completo

(5) Ensino Superior Incompleto

(6) Ensino Superior Completo

(7) Não estudei

(8) IGN

8. No último mês o (a) Sr. (a) trabalhou e ganhou pelo trabalho?

(1) Sim, com carteira assinada

(2) Sim, sem carteira assinada

(3) Sim, funcionário público ou militar

(4) Sim, estudante

(5) Não

(6) Não, estudante

(7) Não, aposentado/pensionista

(8) IGN

AGORA VOU PERGUNTAR SOBRE A SUA SAÚDE. POR FAVOR, AGUARDE ATÉ QUE EU TERMINE DE LER AS OPÇÕES E ENTÃO ESCOLHA UMA DELAS.

9. Em geral o (a) Sr. (a) diria que sua saúde é:

(1) Muito boa

(2) Boa

(3) Regular

(4) Ruim

(5) Muito ruim

(6) IGN

AGORA VOU FAZER ALGUMAS PERGUNTAS SOBRE O BAIRRO EM QUE O (A) SR. (A) MORA.

10. Em qual bairro o Sr. (a) mora? |____

11. Há quanto tempo o (a) Sr. (a) mora neste bairro?

Ano(s) |__ __| Meses |__ __| (1) IGN

NAS PRÓXIMAS QUESTÕES VOU PERGUNTAR SOBRE SUAS ATIVIDADES FÍSICAS DO DIA-A-DIA

12. Qual a principal atividade física que o (a) Sr.(a) praticou em seu tempo de lazer?

- (1) Caminhada (não vale deslocamento para trabalho)
- (2) Caminhada em esteira
- (3) Corrida
- (4) Corrida em esteira
- (5) Musculação
- (6) Ginástica aeróbica
- (7) Hidroginástica
- (8) Ginástica em geral
- (10) Natação
- (11) Artes marciais e luta
- (12) Bicicleta
- (13) Futebol
- (14) Basquetebol
- (15) Voleibol
- (16) Tênis
- (17) Outros (especificar) _____
- (18) NSA
- (19) IGN

13. Na última semana, quantos dias o (a) Sr.(a) praticou atividades físicas moderadas e vigorosas em seu tempo livre?

- (1) Não pratiquei atividades físicas
- (2) 1 a 2 dias por semana
- (3) 3 a 4 dias por semana
- (4) 5 a 6 dias por semana
- (5) Todos os dias
- (5) NSA
- (6) IGN

14. Na última semana, qual seu volume de atividades físicas moderadas e vigorosas em seu tempo livre?

- (1) Menos que 30 minutos
- (2) Entre 31 minutos e 149 minutos
- (3) Igual ou acima de 150 minutos
- (4) NSA
- (5) IGN

15. No seu trabalho, o (a) Sr.(a) pratica atividades físicas (ex.: andar bastante a pé, realização de movimentos contínuos)?

- (1) Não
- (2) Sim
- (3) NSA
- (4) IGN

16. Na última semana, em quantos dias o Sr. (a) assistiu televisão por, pelo menos, três horas em seu tempo livre?

- (6) Nenhum dia
- (7) 1 a 2 dias por semana
- (8) 3 a 4 dias por semana
- (9) 5 a 6 dias por semana
- (10) Todos os dias
- (5) NSA
- (6) IGN

NAS PRÓXIMAS QUESTÕES, VOU PERGUNTAR SOBRE SUA ALIMENTAÇÃO

16. Quantas refeições o(a) Sr.(a) faz por dia? Considerar que refeição é qualquer alimento consumido em horários que caracterizam um hábito para o entrevistado. Devendo, portanto, considerar os lanches consumidos entre as refeições principais.

|__| refeições (1) IGN

17. Quais as refeições e lanches intermediários o(a) Sr.(a) faz por dia e ao lado escreva a onde e com quem as realiza (se realizar as refeições).

() Café da manhã. Local: ____ Companhia: ____ () Almoço Local: ____ Companhia: ____

() Jantar Local: _____

() Lanche da manhã Local: _____. Companhia: _____

() Lanche da tarde Local: _____. Companhia: _____

() Lanche da noite Local: _____. Companhia: _____

Marque o local, a frequência com quem você mais realiza cada refeição? (Marque apenas uma opção para o local, uma opção para a frequência e para a companhia).

17. Com qual frequência, o (a) Sr.(a) costuma comer verduras e legumes crus?

|__| dias (1) IGN

() 2 ou mais vezes por dia

() 1 vez por dia

() 2 a 4 vezes por semana

() 1 vez por semana

() 1 a 3 vezes por mês

() Menos de 1 vez por mês

() Nunca

18. Em quantos dias da semana o(a) Sr.(a) costuma comer carne vermelha (boi, porco)? |__| dias (1) IGN

19. Quando o(a) Sr.(a) come carne vermelha com gordura, o(a) Sr.(a) costuma:

- (1) Tirar sempre o excesso de gordura visível
- (2) Comer com a gordura
- (3) Não come carne vermelha com muita gordura
- (4) NSA
- (5) IGN

20. Com qual frequência Em quantos dias da semana o(a) Sr.(a) costuma comer frango/galinha ou outras aves?

- dias (1) IGN
- 2 ou mais vezes por dia
- 1 vez por dia
- 2 a 4 vezes por semana
- 1 vez por semana
- 1 a 3 vezes por mês
- Menos de 1 vez por mês
- Nunca

21. Quando o(a) Sr.(a) come frango/galinha com pele, o(a) Sr.(a) costuma:

- (1) Tirar sempre a pele
- (2) Comer com a pele
- (3) Não come pedaços de frango/galinha com pele
- (4) NSA
- (5) IGN

22. Com qual frequência ... Em quantos dias da semana o(a) Sr.(a) costuma tomar suco de frutas natural?

- dias (1) IGN
- 2 ou mais vezes por dia
- 1 vez por dia
- 2 a 4 vezes por semana
- 1 vez por semana
- 1 a 3 vezes por mês
- Menos de 1 vez por mês
- Nunca

23. Num dia comum, quantas copos o(a) Sr(a) toma de suco de frutas natural?

- (1) Um copo
- (2) Dois copos
- (3) Três ou mais copos
- (4) NSA
- (5) IGN

24. Em quantos dias da semana o (a) Sr(a) costuma comer frutas?

- dias (1) IGN
- 2 ou mais vezes por dia
- 1 vez por dia
- 2 a 4 vezes por semana
- 1 vez por semana
- 1 a 3 vezes por mês

- Menos de 1 vez por mês
- Nunca

25. Num dia comum, quantas vezes o(a) Sr.(a) come frutas?

- (1) Uma vez no dia
- (2) Duas vezes no dia
- (3) Três ou mais vezes no dia
- (4) NSA
- (5) IGN

26. Em quantos dias da semana o(a) Sr.(a) costuma tomar refrigerantes? Quanto o toma opta com mais frequência qual das versões:

- Normal/ regular Zero/light/Diet
- (ou suco artificial tipo Tampico)?

|__| dias (1) IGN

- 2 ou mais vezes por dia
- 1 vez por dia
- 2 a 4 vezes por semana
- 1 vez por semana
- 1 a 3 vezes por mês
- Menos de 1 vez por mês
- Nunca

27. 26. Em quantos dias da semana o(a) Sr.(a) costuma tomar outras bebidas açucarada (por exemplo: suco em pó, suco tipo néctar (em caixa ou lata)? Quanto toma as bebidas opta com mais frequência qual das versões:

- 2 ou mais vezes por dia
- 1 vez por dia
- 2 a 4 vezes por semana
- 1 vez por semana
- 1 a 3 vezes por mês
- Menos de 1 vez por mês
- Nunca

27. Que tipo?

- (1) Normal
- (2) Diet/light/zero
- (3) Ambos
- (4) NSA
- (5) IGN

28. Quantos copos/latinhas o(a) Sr.(a) costuma tomar? por dia?

|__| copos/latinhas (1) NSA (2) IGN

29. Com qual frequência ... Em quantos dias da semana o(a) Sr.(a) costuma tomar leite? |__| dias (1) IGN
 () 2 ou mais vezes por dia
 () 1 vez por dia
 () 2 a 4 vezes por semana
 () 1 vez por semana
 () 1 a 3 vezes por mês
 () Menos de 1 vez por mês
 () Nunca

30. Quando o(a) Sr.(a) toma leite, que tipo de leite costuma tomar?

- (1) Integral
 (2) Desnatado
 (3) Semidesnatado
 (4) Os dois tipos (integral + desnatado ou semidesnatado)
 (5) NSA
 (6) IGN

31. Em quantos dias na semana o(a) Sr.(a) come alimentos fritos, como batata frita, ovo frito, pastel, aipim frito, bolinho frito?

|__| dias (1) IGN

AGORA VOU FAZER MAIS ALGUMAS PERGUNTAS SOBRE A SUA SAÚDE

Algum médico ou profissional de saúde já disse que o(a) Sr.(a) tem:

31. Doença de coluna ou costas?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
32. Artrite ou reumatismo?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
33. Fibromialgia?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
34. Câncer?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
35. Diabetes?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN

36. Bronquite ou asma?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
37. Hipertensão (pressão alta)?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
38. Doença do coração ou cardiovascular?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
39. Insuficiência renal crônica?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
40. Depressão?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
41. Esquizofrenia?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
42. Tuberculose?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN

43. Tendinite ou tendossinovite?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
44. Cirrose?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
45. Derrame, AVC ou isquemia cerebral?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN
46. Úlcera no estômago ou duodeno?	(1) Não	(2) Sim	(3) IGN

AGORA EU VOU FAZER ALGUMAS PERGUNTAS SOBRE O USO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E DURANTE O ÚLTIMO ANO: LEVE EM CONSIDERAÇÃO BEBIDAS COMO CERVEJA, CACHAÇA, VODKA, WHISKY E VINHO.

47. Com que frequência o(a) Sr.(a) toma bebidas alcoólicas?

- (1) Nunca
- (2) Mensalmente ou menos
- (3) De 2 a 4 vezes por mês
- (4) De 2 a 3 vezes por semana
- (5) De 4 ou mais vezes por semana
- (6) NSA
- (7) IGN

48. Quantas doses de álcool o(a) Sr.(a) toma normalmente ao beber? (ver quadro de equivalência de dose padrão abaixo)

- (1) 0 ou 1
- (2) 2 ou 3
- (3) 4 ou 5
- (4) 6 ou 7
- (5) 8 ou mais
- (6) NSA
- (7) IGN



EORTC QLQ-C30 (versão 3.0)

Nós estamos interessados em alguns dados sobre você e sua saúde. Responda, por favor, a todas as perguntas fazendo um círculo no número que melhor se aplica a você. Não há respostas certas ou erradas. As informações que você fornecer permanecerão estritamente confidenciais.

Por favor, preencha suas iniciais:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Sua data de nascimento (dia, mês, ano):

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Data de hoje (dia, mês, ano):

31

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	Não	Pouco	Moderadamente	Muito
1. Você tem alguma dificuldade quando faz grandes esforços, por exemplo carregar uma bolsa de compras pesada ou uma mala?	1	2	3	4
2. Você tem alguma dificuldade quando faz uma <u>longa</u> caminhada?	1	2	3	4
3. Você tem alguma dificuldade quando faz uma curta caminhada fora de casa?	1	2	3	4
4. Você tem que ficar numa cama ou na cadeira durante o dia?	1	2	3	4
5. Você precisa de ajuda para se alimentar, se vestir, se lavar ou usar o banheiro?	1	2	3	4

Durante a última semana:

	Não	Pouco	Moderadamente	Muito
6. Tem sido difícil trabalhar ou realizar suas atividades diárias?	1	2	3	4
7. Tem sido difícil praticar seu hobby ou participar de atividades de lazer?	1	2	3	4
8. Você teve falta de ar?	1	2	3	4
9. Você tem tido dor?	1	2	3	4
10. Você precisou repousar?	1	2	3	4
11. Você tem tido problemas para dormir?	1	2	3	4
12. Você tem se sentido fraco/a?	1	2	3	4
13. Você tem tido falta de apetite?	1	2	3	4
14. Você tem se sentido enjoado/a?	1	2	3	4
15. Você tem vomitado?	1	2	3	4
16. Você tem tido prisão de ventre?	1	2	3	4

Por favor, passe à página seguinte



EORTC OLO – CR29

Às vezes os pacientes relatam que têm os seguintes sintomas ou problemas. Por favor, indique em que medida sentiu estes sintomas ou problemas durante a última semana. Por favor faça um círculo no número que melhor se aplica ao seu caso.

Durante a última semana:	Não	Pouco	Moderada-	Muito
			mente	
31. Você urinou muitas vezes durante o dia?	1	2	3	4
32. Você urinou muitas vezes durante a noite?	1	2	3	4
33. Já teve vazamentos involuntários de urina?	1	2	3	4
34. Você teve dores ao urinar?	1	2	3	4
35. Você teve dor na barriga?	1	2	3	4
36. Você teve dor em suas nádegas/região anal/reto?	1	2	3	4
37. Você teve a sensação de barriga inchada?	1	2	3	4
38. Você teve sangue nas fezes?	1	2	3	4
39. Você teve muco em suas fezes?	1	2	3	4

Durante a última semana:	Não	Pouco	Moderada-	Muito
			mente	
40. Você Sentiu a boca seca?	1	2	3	4
41. Você perdeu o cabelo como resultado do seu tratamento?	1	2	3	4
42. Você teve dificuldades em sentir o sabor dos alimentos?	1	2	3	4
43. Você se sentiu preocupado(a) com sua saúde no futuro?	1	2	3	4
44. Você se preocupou com seu peso?	1	2	3	4
45. Você se sentiu menos atraente fisicamente como resultado da doença ou tratamento?	1	2	3	4
46. Você tem se sentido menos feminina (mulher)/masculino (homem), como resultado da sua doença ou tratamento?	1	2	3	4
47. Você se sentiu insatisfeito(a) com seu corpo?	1	2	3	4
48. Você tem uma bolsa de colostomia/ileostomia? Por favor circule a resposta correta	Sim	Não		

Por favor, passe à página seguinte

(PORTUGUESE BRAZIL)

Durante a última semana:

Não Pouco Moderada- Muito
mente

Responda a estas questões APENAS SE VOCÊ TEM UMA BOLSA DE COLOSTOMIA/ILEOSTOMIA, se não tem, continue abaixo:				
49. Você teve perda sem querer de gases (flatos) pela bolsa de colostomia/ileostomia?	1	2	3	4
50. Você teve vazamento de fezes na sua bolsa de colostomia/ileostomia?	1	2	3	4
51. Você teve a pele ferida em torno da sua colostomia/ileostomia?	1	2	3	4
52. Você teve que trocar a bolsa de colostomia várias vezes durante o dia?	1	2	3	4
53. Você teve que trocar a bolsa de colostomia várias vezes durante a noite?	1	2	3	4
54. Você se sentiu envergonhado/a por causa da sua colostomia/ileostomia?	1	2	3	4
55. Você teve problemas para cuidar da sua colostomia/ileostomia?	1	2	3	4

Responda estas questões APENAS SE VOCÊ NÃO TEM UMA BOLSA DE COLOSTOMIA/ILEOSTOMIA:				
49. Você teve perda sem querer de gases/flatos do seu ânus?	1	2	3	4
50. Você teve vazamento de fezes pelo ânus?	1	2	3	4
51. Você teve a pele ferida em volta da região anal?	1	2	3	4
52. Ocorreram movimentos intestinais frequentes durante o dia?	1	2	3	4
53. Ocorreram movimentos intestinais frequentes durante a noite?	1	2	3	4
54. Você se sentiu envergonhado/a por causa de seu movimento intestinal?	1	2	3	4

Durante as últimas quatro semanas:

Não Pouco Moderada- Muito
mente

Só para homens:				
56. Até que ponto esteve interessado/a em sexo?	1	2	3	4
57. Você teve alguma dificuldade em ter ou manter uma erecção?	1	2	3	4

Só para mulheres:				
58. Até que ponto esteve interessado/a em sexo?	1	2	3	4
59. Você teve dor ou desconforto durante a relação sexual?	1	2	3	4