

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE CHAPECÓ
CURSO DE MEDICINA**

**ANA LUÍSA RASCH DOS SANTOS
VICTOR DANIEL SCHMOLLER**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM
PLAQUETAS DE PACIENTES COM LESÃO INTRAEPITELIAL
DE ALTO GRAU DO COLO UTERINO**

**CHAPECÓ
2022**

**ANA LUÍSA RASCH DOS SANTOS
VICTOR DANIEL SCHMOLLER**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM
PLAQUETAS DE PACIENTES COM LESÃO INTRAEPITELIAL
DE ALTO GRAU DO COLO UTERINO**

Trabalho de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Chapecó, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Médico(a).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Zanini

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréia Cardoso Machado

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Wagner

CHAPECÓ

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Schmoller, Victor Daniel

Avaliação da atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas de pacientes com lesão intraepitelial de alto grau do colo uterino / Victor Daniel Schmoller, Ana Luísa Rasch dos Santos. -- 2022. 28 f.:il.

Orientadora: Doutora Daniela Zanini

Coorientadores: Doutora Andréia Cardoso Machado, Doutora Adriana Wagner

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2022.

1. Lesão intraepitelial de alto grau do colo uterino. 2. Sinalização purinérgica. 3. Atividade enzimática. 4. Imunossupressão. I. Santos, Ana Luísa Rasch dos Santos. II. Zanini, Daniela, orient. III. Machado, Andréia Cardoso, co-orient. IV. Wagner, Adriana, co-orient. V. Universidade Federal da Fronteira Sul. VI. Título.

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

ANA LUÍSA RASCH DOS SANTOS

VICTOR DANIEL SCHMOLLER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO
EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM LESÃO INTRAEPITELIAL DE
ALTO GRAU DO COLO UTERINO**

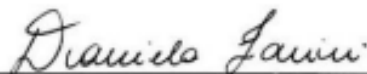
Trabalho de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção de aprovação no respectivo componente da grade do Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul - campus Chapecó.

Orientadora: **Professora Dr.^a Daniela Zanini**

Coorientadora: **Professora Dr.^a Andréia Machado Cardoso**

Este trabalho de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 30/08/2022

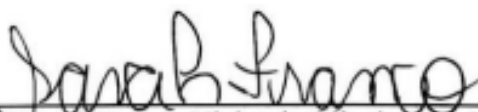
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Daniela Zanini – UFFS – Campus Chapecó

Prof.^a Dr.^a Daniela Zanini -UFFS

Orientadora



Prof.^a Dr.^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel - UFFS

Prof.^a Dr.^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel - UFFS

Avaliador 1



Prof.^o Esp. Jaime Dias Cardoso Júnior - UFFS

Prof.^o Esp. Jaime Dias Cardoso Júnior — UFFS

Avaliador 2

RESUMO

As lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (HSIL) são precursoras do câncer de colo uterino (CCU), ocorrendo principalmente associadas à infecção por subtipos oncogênicos do Papilomavírus humano (HPV). Há muito tem-se proposto que modificações na sinalização purinérgica estão associadas à ocorrência de inúmeros processos patológicos, incluindo as HSIL e o CCU. Fazem parte do sistema purinérgico, especialmente, os nucleotídeos de adenina e o nucleosídeo adenosina, que agem em purinoreceptores e são metabolizados por enzimas como a NTPDase (CD39), a 5'-nucleotidase (CD73) e a adenosina desaminase (ADA), que estão presentes em inúmeros tipos celulares, incluindo células malignas, e também em plaquetas. Pela existência de algumas evidências que associam o desenvolvimento e a progressão de lesões cervicais com alterações na atividade das enzimas purinérgicas, torna-se fundamental elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia desses processos. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a atividade da CD39, da CD73 e da ADA em plaquetas de mulheres diagnosticadas com HSIL, anteriormente a qualquer intervenção terapêutica, comparadas com um grupo controle saudável. Fizeram parte desse estudo 32 mulheres com diagnóstico citopatológico de HSIL e 40 mulheres do grupo controle. As atividades enzimáticas foram avaliadas por meio de método colorimétrico e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, sendo $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. Como resultado, as mulheres com HSIL apresentaram maior atividade da CD39 e da CD73 e uma diminuição na atividade da ADA quando comparadas ao grupo controle saudável. Esses resultados sugerem que os nucleotídeos ATP, ADP e AMP estão sendo extensamente hidrolisados nas pacientes com lesões cervicais, promovendo um acúmulo de adenosina no organismo. Tomados em conjunto, nossos achados corroboram o entendimento de que o aumento nos níveis de adenosina favorece um estado imunodeprimido, através da produção de IL-10 e TGF- β 1, o qual propicia a progressão da lesão intraepitelial cervical, assim como, facilitaria o desenvolvimento de tumores invasivos.

Palavras-chave: Lesão intraepitelial de alto grau do colo uterino; Sinalização purinérgica; Atividade enzimática; Imunossupressão.

ABSTRACT

High grade cervical intraepithelial lesions (HSIL) are precursors of uterine cervical cancer (CCU), occurring especially associated to oncogenic subtypes of Human Papillomavirus (HPV). For a long time it has been proposed that modifications in the purinergic signaling are associated with the occurrence of countless pathological processes, including HSIL and CCU. Are part of the purinergic system, specially, the adenine nucleotides and the nucleoside adenosine, which act in purinereceptors and are metabolized by enzymes such as NTPDase (CD39), 5'-nucleotidase (CD73) and adenosine deaminase (ADA), and are present in countless celular types, including malignant cells, and also in platelets. By the existence of some evidence that links the development and progression of cervical lesions to modifications in the purinergic enzymes activity, it becomes fundamental to clarify the mechanisms involved in the pathophysiology of these processes. Thus, the present study aimed to evaluate the activity of CD39, CD73 and ADA in platelets of women diagnosed with HSIL, before any therapeutic intervention, compared to a healthy control group. Were part of this study 32 women with cytopathological diagnosis of HSIL and 40 women from the control group. The enzymatic activities were evaluated by colorimetric method and the results were expressed as mean \pm standard deviation, with $p < 0,05$ being considered statistically significant. As for results, women with HSIL presented higher activity of CD39 and CD73 and a lower activity of ADA when compared to the healthy control group. These results suggest that nucleotides ATP, ADP and AMP are being extensively hydrolyzed in patients with cervical lesions, promoting an accumulation of adenosine in the organism. Taken together, our findings corroborate to an understanding that the increase in adenosine levels favors an immunosuppressed state, through production of IL-10 and TGF- β 1, which would favor the progression of the cervical intraepithelial lesion, as well as, facilitate the development of invasive tumors.

Keywords: High grade intraepithelial lesion of the uterine cervix; Purinergic signaling; Enzymatic activity; Immunosuppression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Atividade da NTPDase.....	14
Figura 2 – Atividade da 5'-nucleotidase.....	15
Figura 3 – Atividade da ADA.....	15

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 METODOLOGIA	12
2.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO E AMOSTRAS	12
2.2 COLETA, PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	12
2.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	12
2.3.1 Atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase	12
2.3.2 Atividade da adenosina deaminase (ADA)	13
2.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	13
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	13
2.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	13
3 RESULTADOS	14
4 DISCUSSÃO	16
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

As lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (HSIL) são decorrentes da proliferação celular acentuada no colo do útero, cujo processo de maturação ocorre de forma atípica. Por promoverem a substituição das células escamosas do epitélio cervical, as HSIL se comportam como lesões precursoras do carcinoma de células escamosas do colo uterino, ou seja, do câncer de colo uterino (CCU) (WHO, 2020). Nesse contexto, vale destacar a grande incidência desse tipo tumoral na população mundial. O CCU é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 604 mil novos casos globais relatados em 2020, e a quarta causa mais frequente de óbito por câncer nessa população, correspondendo a mais de 340 mil óbitos no mesmo ano (GLOBOCAN, 2021). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que para cada ano do triênio 2020/2022, sejam diagnosticados 16.590 novos casos dessa doença, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019).

O rastreamento das neoplasias cervicais configura importante relevância na redução da mortalidade por CCU, uma vez que as lesões precursoras são altamente curáveis. A Organização Mundial da Saúde sugere que os melhores métodos para rastreio são aqueles baseados na citologia e, ainda com maior especificidade, testagem para infecção por HPV (WHO, 2020). No Brasil, as recomendações indicam a realização de exame citopatológico, popularmente conhecido como Papanicolau, em mulheres de idade entre 25 e 64 anos que já tenham iniciado sua vida sexual, além de determinar a necessidade de realização de colposcopia quando se verifica neoplasia de alto grau (INCA, 2016). A Sociedade Americana de Oncologia Clínica indica, inicialmente, a busca por DNA viral do HPV (JERONIMO et al., 2016), e países como Austrália, Itália e Alemanha já possuem seu rastreio baseado nesse método, pelo entendimento de que a infecção pelo vírus é essencial para o desenvolvimento inicial das atipias cervicais no CCU (BHATLA; SINGHAL, 2020).

A infecção persistente pelos subtipos oncogênicos, especialmente 16 e 18, do Papilomavírus humano (HPV) está fortemente associada ao desenvolvimento das HSIL e do CCU (BRUNI et al., 2019), representando o principal fator de risco relacionado à sua ocorrência (CHEN et al., 2018). Habitualmente, a infecção pelo HPV no colo do útero é transitória, ou seja, regride de forma espontânea após 6 meses a 2 anos (WHO, 2008). No entanto, se a infecção causada por um subtipo oncogênico persistir, ela pode progredir e ocasionar o desenvolvimento das lesões precursoras do câncer, as neoplasias intraepiteliais (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF

CERVICAL CANCER, 2006; CAMPION; CANFELL, 2015). Demais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do CCU estão associados ao tabagismo, existência de parceiros sexuais múltiplos e início de atividade sexual em idade precoce (BRASIL, 2013).

As lesões precursoras são categorizadas de acordo com a proporção epitelial acometida, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) I, II e III. Em 1988 surgiu um sistema de classificação para as NICs conforme seu potencial de evoluírem para lesões malignas, o sistema Bethesda, que foi posteriormente revisado e é utilizado para padronização dos laudos de exames citopatológicos do colo uterino. As NICs I são consideradas lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau (LSIL), uma vez que normalmente sofrem regressão espontânea e dificilmente sofrem malignização, enquanto que as NICs II e III são denominadas de alto grau ou HSIL (NAYAR; WILBUR, 2015). O diagnóstico precoce das lesões precursoras, especialmente as de alto grau, é a base para a prevenção do CCU (OMS, 2018).

A sinalização purinérgica, por sua vez, possui importante atuação na regulação de processos fisiológicos e patológicos de diversos tecidos, exercendo, ainda, influência no microambiente tumoral de neoplasias em diferentes órgãos, como mama, estômago, pulmão, reto e colo do útero, promovendo alterações de vias apoptóticas e de mecanismos da resposta imune (REYNA-JALDES et al., 2021). Estudos demonstraram que ocorre alteração na expressão de ectonucleotidases, enzimas responsáveis pela degradação de nucleotídeos de adenosina, em linhagens de células provenientes de tumores de colo do útero (BECKENKAMP et al., 2014). Dessa forma, o acúmulo de metabólitos provenientes da metabolização desses nucleotídeos poderia modular negativamente a resposta imune, favorecendo o desenvolvimento tumoral dos diversos estágios de neoplasias cervicais (BAHREYNI et al., 2018).

As ectonucleotidases, nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase/CD39) e 5'-nucleotidase (CD73), são responsáveis pela degradação do trifosfato de adenosina (ATP) e consequente produção de adenosina, exercendo controle sobre as concentrações extracelulares dessas moléculas (MALDONADO et al., 2012). A CD39 promove a desfosforilação do ATP a difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP), que é, por conseguinte, metabolizado à adenosina pela CD73 (JOHNSTON-COX; RAVID, 2011). A adenosina, em seguida, é convertida em inosina pela adenosina desaminase (ADA) (DA CUNHA, 1991). De tal forma, essas enzimas regulam as concentrações extracelulares desses compostos e suas respectivas ações nos receptores do sistema purinérgico.

O grupo de purinoreceptores P1, que exerce funções biológicas pelo acoplamento à

proteína G, é composto pelos subtipos A1, A2a, A2b e A3 (FERRARI; MALAVASI; ANTONIOLI, 2017), tendo a adenosina como principal ligante agonista natural (OURY et al., 2006). Os receptores P2 podem ser ionotrópicos, agindo como canais iônicos que transportam cátions como Na⁺, K⁺ e Ca²⁺, receptores P2X1-7, ou metabotrópicos, acoplados à proteína G, receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-14 (FERRARI; MALAVASI; ANTONIOLI, 2017), reconhecendo purinas e pirimidinas como ligantes (OURY et al., 2006). A região do colo uterino expressa uma diversidade de purinoreceptores (BURNSTOCK, 2014), enquanto nas plaquetas podem ser encontradas as moléculas A2a, A2b, P2X1, P2Y1, P2Y12 e P2Y14 (KUNAPULI et al., 2003; GACHET; HECHLER, 2020).

Plaquetas são as menores células presentes na circulação sanguínea, derivadas de megacariócitos da medula óssea, e exercem funções bem estabelecidas no controle da homeostase e formação de trombos a partir da lesão no endotélio vascular (HOLINSTAT, 2017). A ativação plaquetária é influenciada pelos purinoreceptores expressos na superfície dessas células, P2X1, que possui como agonista o ATP, P2Y1 e P2Y12, que respondem ao estímulo por ADP, e promovem alterações conformacionais, agregação e liberação de grânulos e secreção de tromboxano A2 (KIM; KUNAPULI, 2011). De forma antagônica, plaquetas também expressam os receptores A2a e A2b, que respondem ao estímulo por adenosina resultando em liberação intracelular de AMP cíclico e consequente inibição das funções exercidas pelos receptores P2 (BONCLER et al., 2019). Entretanto, além da atividade pró-trombótica, estudos demonstraram, ainda, um papel relevante das plaquetas na modulação da resposta imune, formação de metástases e interações responsáveis pela facilitação do avanço de tumores (KROUPENOVA et al., 2018; PALACIOS-ACEDO et al., 2019; FRANCO; CORKEN; WARE, 2015).

O microambiente tumoral das neoplasias cervicais induz a superexpressão de CD39 e CD73 (BECKENKAMP et al., 2014), aumentando a degradação de ATP e elevando os níveis de adenosina (DI VIRGILIO et al., 2018). A adenosina, por sua vez, é capaz de estimular a produção do fator de crescimento transformador-beta 1 (TGF-β1) através da sinalização em receptores P1 dos tipos A2a e A2b (GARCÍA-ROCHA et al., 2019). Dessa forma, ocorre a atenuação da resposta imune durante a progressão tumoral de vários estágios de neoplasias cervicais, principalmente pela ação de citocinas anti-inflamatórias (BAHREYNI et al., 2018). Nesse sentido, sabendo-se das interações e indução de respostas celulares e teciduais em decorrência da sinalização purinérgica e constatando-se que essas moléculas podem desempenhar um papel promissor como alvo de drogas antineoplásicas (MERIGHI et al., 2003), assim como no processo de controle do desenvolvimento e da progressão tumoral, esse

estudo objetiva avaliar a atividade das enzimas CD39, CD73 e ADA em plaquetas de pacientes com diagnóstico de HSIL.

2 METODOLOGIA

2.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO E AMOSTRAS

Este é um estudo de caráter quantitativo que buscou avaliar a atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas de pacientes com lesão cervical. As participantes consistiram em pacientes voluntárias femininas que utilizavam os serviços de saúde do município de Chapecó (SC), tais como a Clínica da Mulher, Centros de Saúde da Família e Central de Referência em Saúde Municipal e que apresentaram um resultado de colpocitologia oncótica com HSIL e não iniciaram o tratamento da lesão (n = 32). O grupo controle foi composto por voluntárias sadias cuja colpocitologia oncótica cervical foi normal (n = 40).

2.2 COLETA, PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A coleta das amostras ocorreu por punção venosa, através da obtenção de oito mililitros (8 mL) de sangue total em tubos *vacutainer*, contendo citrato como anticoagulante, para a separação de plaquetas. A coleta de sangue dos controles e pacientes foi realizada em um único momento por profissional habilitado. O *pellet* de plaquetas foi obtido a partir do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), de acordo com o protocolo descrito por Pilla et al. (1996). As amostras de plaquetas foram congeladas em freezer a -80°C para as posteriores análises nos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul.

2.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

2.3.1 Atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase

A atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas foi determinada de acordo com o protocolo previamente descrito por Pilla et al. (1996). A atividade foi determinada medindo a quantidade de fosfato inorgânico liberado usando um ensaio colorimétrico. O meio de reação continha 5 mM de CaCl_2 , NaCl 100 mM, KCl 5 mM, glicose 6 mM e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 em um volume final de 200 μL . Um volume de 20 μL de solução com plaquetas foi adicionado ao meio de reação (0,4 - 0,6 mg/mL de proteína) e pré-incubado por 10 minutos a 37°C . A reação foi iniciada pela adição do substrato (ATP ou ADP) a uma concentração final de 1 mM e interrompida com 200 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% para fornecer uma concentração final de 5%. Para a hidrólise do AMP, através da atividade da 5'-nucleotidase, o mesmo processo acima foi realizado, contudo, substituiu-se 5 mM CaCl_2 por 10 mM de MgCl_2 e o nucleotídeo adicionado apresentava concentração de 2

mM de AMP. As amostras foram resfriadas em gelo por 10 min antes de testar a liberação de fosfato inorgânico (Pi) conforme descrito por Chan et al. (1986), usando verde malaquita como reagente colorimétrico e KH_2PO_4 como padrão. As análises foram executadas em duplicata, e a atividade foi expressa como nmol Pi/min/mg proteína.

2.3.2 Atividade da adenosina deaminase (ADA)

A atividade da enzima ADA, também em plaquetas, foi determinada de acordo com o protocolo já descrito de Giusti e Galanti (1984). A quantidade de 50 μL de plaquetas reagiram com 21 mmol/L de adenosina pH 6,5 e foram incubados a 37°C por 60 min. Este método baseia-se na produção direta de amônia quando a ADA atua em excesso da adenosina. O teor de proteína utilizado para o experimento foi ajustado para a faixa de 0,4 - 0,6 mg/mL de proteína. Os resultados foram expressos em U/L.

2.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Coomassie *blue*, descrito por Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Primeiramente, os dados foram avaliados quanto a sua normalidade, ou seja, submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para que se pudesse definir se seguiam ou não uma distribuição normal. Posteriormente, as comparações entre as médias dos grupos foram realizadas por meio de teste t de *student* (teste paramétrico). O nível de significância utilizado foi de 0,05, ou seja, tanto as diferenças entre as médias quanto as correlações foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O programa (*software*) estatístico utilizado foi o *Graph Pad Prism* versão 9.0.

2.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob parecer número 10329219.3.0000.5564 e estão de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Para participar do estudo, as participantes selecionadas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, fornecido pelos pesquisadores.

3 RESULTADOS

Foram excluídas da pesquisa 3 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermoide invasor, totalizando 32 pacientes com HSIL. Em relação à faixa etária das participantes da pesquisa, as idades foram estatisticamente semelhantes no grupo das pacientes com HSIL (35 ± 12) quando comparadas ao grupo controle (34 ± 6).

Sobre a atividade da CD39 em plaquetas, observou-se um aumento na hidrólise do ATP nas pacientes com HSIL quando comparadas com o grupo controle [$18,500 \pm 7,079$ (n=28) vs. $8,250 \pm 3,467$ (n=36), respectivamente], $p < 0,05$ (Figura 1A). Semelhantemente, a atividade da NTPDase, para a hidrólise do ADP, também foi estatisticamente maior no grupo de pacientes com NIC quando comparadas com o grupo controle [$13,920 \pm 6,661$ (n=23) vs. $4,000 \pm 1,782$ (n=34), respectivamente], $p < 0,05$ (Figura 1B).

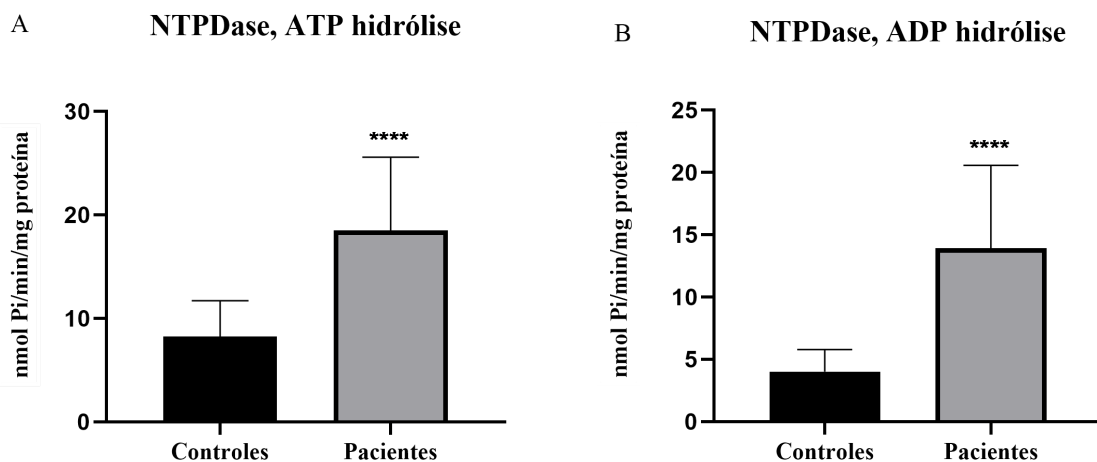


Figura 1: Atividade da NTPDase. A) Atividade da NTPDase utilizando ATP como substrato. B) Atividade da NTPDase utilizando ADP como substrato. ****Indica $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

Adicionalmente, a hidrólise do AMP, através da atividade da CD73, mostrou-se significativamente aumentada no grupo de mulheres com HSIL em comparação ao grupo controle [$12,920 \pm 6,660$ (n=23) vs. $5,222 \pm 4,227$ (n=37), respectivamente], $p < 0,05$ (Figura 2).

5'-nucleotidase, AMP hidrólise

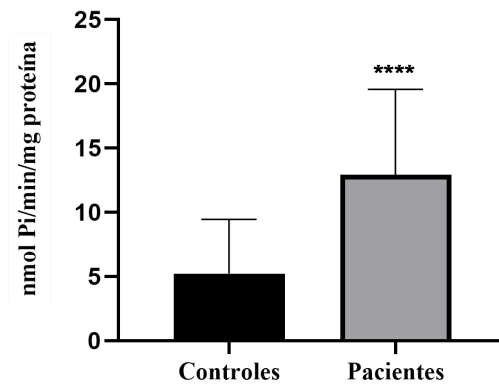


Figura 2: Atividade da 5'-nucleotidase. ****Indica $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

A Figura 3 representa a atividade da ADA. Como é possível observar, houve uma diminuição estatisticamente significativa na atividade da ADA no grupo de pacientes com HSIL quando comparadas com o grupo controle [$3,123 \pm 1,855$ (n=16) vs. $5,677 \pm 1,792$ (n=34) respectivamente], $p < 0,05$.

ADA

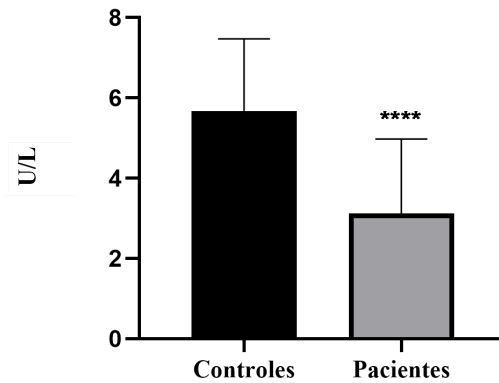


Figura 3: Atividade da ADA em plaquetas. ****Indica $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

4 DISCUSSÃO

Apesar da grande prevalência de infecção pelo HPV em mulheres sexualmente ativas, na maior parte dos casos ocorre regressão espontânea após a exposição ao vírus, entretanto, uma minoria de indivíduos evolui para o desenvolvimento das HSILs. Um estudo brasileiro, realizado por Mattos, verificou uma diminuição importante nos casos de HSIL no estado da Bahia entre 2010 e 2014: 4172 LSIS 2010 para 1017 em 2014, e 2301 HSIL em 2010 para 380 em 2014 (MATTOS, 2016). Outros pesquisadores demonstraram que, em mulheres infectadas por HPV de alto risco, a incidência estimada de HSIL foi de 1 para cada 100 mulheres-ano, produzindo um risco cumulativo de 2,1%, 4,3% e 6,4% em 1, 3 e 5 anos, respectivamente (MALAGÓN et al., 2020).

O desenvolvimento e a progressão de neoplasias envolvem a atenuação de mecanismos imunes, prevenindo o reconhecimento das células tumorais e a ação de células efetoras, como linfócitos, somada a promoção de vasculogênese, que proporciona maior aporte sanguíneo para o tumor, uma vez que ele possui demandas metabólicas exacerbadas em decorrência das alterações na fisiologia tecidual. Nas neoplasias de colo do útero, o estudo do microambiente tumoral evidencia a presença de moléculas e estruturas, encontradas também no cérvix de mulheres saudáveis, que estão expressas de forma desregulada, o que promove a progressão e desenvolvimento das células neoplásicas (BECKENKAMP et al., 2014). Nesse sentido, diversos estudos buscaram demonstrar a relação entre as concentrações e atividade de ectonucleotidases e seus metabólitos, ATP, ADP, AMP e adenosina, na presença de NICs de diferentes graus e CCU em estágios mais avançados (DE LOURDES MORA-GARCÍA et al., 2016; DE LOURDES MORA-GARCÍA et al., 2019; MALDONADO et al., 2012; MALDONADO et al., 2010; MUÑOZ-GODÍNEZ et al., 2020).

Nossos resultados demonstraram uma superexpressão da CD39 e da CD73 nas plaquetas de mulheres com HSIL. De Lourdes Mora-Garcia e colaboradores (2019) relacionaram a ocorrência de NIC I, especialmente aqueles associados à infecção por HPV-16, com aumento das concentrações de CD39 e CD73 nas células neoplásicas. Muñoz-Godínez e colaboradores (2020) determinaram as atividades de CD39 e CD73 em mulheres com LSIL e HSIL e CCU, observando que suas concentrações nas células displásicas aumentavam conforme a progressão da doença. Maldonado e colaboradores (2010) indicaram que a realização de conização e radioterapia para tratamento das lesões uterinas cervicais foi capaz de reduzir a hidrólise de ATP e ADP nas plaquetas de mulheres com diagnóstico prévio de

NIC III ou carcinoma uterino microinvasor e que finalizaram o tratamento entre 1 e 5 anos anteriormente ao estudo.

O microambiente tumoral é sabidamente rico em ATP, proveniente da injúria tecidual provocada pela neoplasia, estresse, morte celular e hipóxia (DI VIRGILIO et al., 2018; KEPP et al., 2021). Em resposta ao acúmulo dessa molécula e considerando seus efeitos, as células, especialmente as tumorais, fisiologicamente expressam enzimas que promovem sua degradação (BECKENKAMP et al., 2014). A CD39 e CD73 desempenham suas funções transformando um ambiente pró-inflamatório, devido à presença de ATP e ADP, em um ambiente anti-inflamatório (MORELLO et al., 2021). Sabendo-se dessas interações, foi demonstrado que a infecção pelo HPV-18 em linhagens neoplásicas de colo uterino, por si só, induz a uma superexpressão da CD73, possivelmente associada às oncoproteínas virais E6 e E7 (DE LOURDES MORA-GARCÍA et al., 2017). Esses mecanismos moleculares resultam em um acúmulo de adenosina nesse meio, nucleosídeo que possui atividade anti-inflamatória e promove a progressão tumoral, proliferação de células cancerosas, evasão da resposta imune e emissão de metástases (ANTONIOLI et al., 2013).

Por ser um catabólito imediato dos nucleotídeos de adenina, é pertinente utilizar da adenosina para analisar situações fisiológicas, bem como patológicas, que resultam na degradação desses nucleotídeos (SPYCHALA, 2000). Por exemplo, a liberação dessa molécula a partir da hidrólise de ATP, ADP e AMP, seguida de sua ligação aos seus receptores nas células imunes, representa uma potente via imunossupressora endógena que regula a resposta imune aos insultos externos (HASKO, CRONSTEIN, 2004). Desse modo, supõe-se que aumento de adenosina e consequente inibição da ação imune, é um fator potencialmente contribuinte para o crescimento tumoral, angiogênese e inibição da síntese de citocinas (HASKO, CRONSTEIN, 2004). No que se refere à patogênese do câncer ginecológico, estudos reforçam que a hidrólise dos nucleotídeos em adenosina via atividade de CD39 e CD73, tanto no ambiente tumoral cervical quanto ovariano, diminui a proliferação, ativação e funções de células imunes efectoras (DE LOURDES MORA-GARCÍA ET AL., 2016).

Os mecanismos pelos quais a adenosina cumpre suas funções pró-tumorais é de relevante importância para o entendimento da carcinogênese e transformação das lesões pré-neoplásicas em tumores invasores na cérvix uterina. Dessa forma, em seus estudos, Gutierrez e colaboradores (2014), demonstraram que a ativação dos receptores A2a e A2b é capaz de suavizar a resposta imune durante o desenvolvimento de diferentes estágios do CCU, principalmente pela superexpressão de interleucina 10 (IL-10) e pela regulação negativa dos antígenos HLA-Classe I. Torres-Pineda e colaboradores (2020) encontraram resultados

semelhantes, relacionando a ação da adenosina em culturas de células cervicais cancerosas com um aumento dose-dependente na produção de IL-10, pela sinalização ao receptor A2b, somada à redução na expressão de HLA-Classe I e consequente proteção contra ação de linfócitos T. A IL-10 é classicamente caracterizada como uma citocina imunossupressora, envolvida em processos de inibição na produção de citocinas e quimiocinas, redução na transcrição de HLA-Classe II e diminuição da liberação de espécies reativas de oxigênio (MANNINO et al., 2015; SARAIVA; VIEIRA; O’GARRA, 2020). De maneira sinérgica, a adenosina também é capaz de amplificar a produção do TGF- β 1 por meio da sinalização em receptores A2 em células neoplásicas cervicais, molécula que induz superexpressão de CD73 (GARCÍA-ROCHA et al., 2019). Plaquetas também são fontes conhecidas de TGF- β , e sua secreção está relacionada à evasão da resposta imune, progressão do tumor e emissão de metástases (PALACIOS-ACEDO et al., 2019; KOUPENOVA et al., 2018)

Além do acúmulo de adenosina promovido pelas ectonucleotidases, demais estudos relacionaram a superexpressão da CD73 com outros mecanismos de progressão tumoral. Foi demonstrado que nas NICs e no CCU ocorre aumento na microvasculatura dessas neoplasias, proporcionalmente à severidade, indicando que existe atividade angiogênica aumentada (DELLAS et al., 1997). Nesse sentido, Gao e colaboradores (2017) relacionaram a amplificação da CD73 em células cervicais cancerosas com um aumento na expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). No entanto, o bloqueio da ectonucleotidase não foi capaz de reverter os efeitos sobre a proliferação e migração celular observados, ou seja, pode não estar relacionado à sua atividade enzimática. De forma análoga, observou-se que a hiperatividade da CD73 induziu superexpressão de EGFR associada a proliferação de células cervicais cancerosas *in vitro* e *in vivo*, corroborando para o entendimento que esse receptor exerce funções importantes na progressão de tumores (LIU et al., 2022).

Neoplasias estão diretamente ligadas à eventos trombóticos e alterações de coagulação, uma vez que se entende que o câncer é o principal fator de risco para a ocorrência de tromboembolismo venoso (TEV), motivado pela liberação de fator tecidual e outros compostos ativadores da cascata de coagulação (MUKAI; OKA, 2018). O risco para a ocorrência de TEV é maior em diversas malignidades, sendo que nos cânceres de cérvix uterina, esse risco foi 3,3 vezes maior nos primeiros 5 anos após diagnóstico do que na população geral (FERNANDES et al., 2019). As plaquetas exercem papel fundamental na formação de trombos nesses pacientes, pois o tumor secreta fatores ativadores dessas células, a exemplo do ATP e sua consequente degradação em ADP, relacionada à ativação plaquetária

através dos receptores P2Y1 e P2Y12, que promove agregação e auxilia na emissão de metástases (KIM; KHORANA; MCCRAE, 2020). Nesse cenário, considerando a associação entre neoplasia-plaquetas e seus efeitos na progressão tumoral, especialmente via sinalização P2Y12 (BALLERINI et al., 2018), cogita-se a utilização de antagonistas de P2Y12 na prevenção de eventos trombóticos e, possivelmente, redução na emissão de metástases em pacientes com câncer (WRIGHT et al., 2020).

A adenosina, por sua vez, é um antagonista natural do receptor P2Y12, capaz de inibir a reatividade plaquetária (CIMPEAN, 2004) pela sinalização em receptores A2a e A2b (FUENTES et al., 2014). As ectoenzimas CD39 e ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), bem como CD73 e ADA são fisiologicamente expressas em células normais (ZIMMERMANN, 2001), onde hidrolisam ATP, ADP e AMP, formando, como consequência, moléculas de adenosina. Em nosso trabalho evidenciamos um acúmulo de adenosina associado à superexpressão das ectonucleotidases pelas plaquetas, e hipotetizamos que esse mecanismo pode estar relacionado à alta concentração de nucleotídeos presente no microambiente tumoral, como uma resposta fisiológica à hiperatividade plaquetária proporcionada pelo ADP e considerando que a adenosina age inibindo essa via. O acúmulo de adenosina também foi corroborado pelo achado em nosso estudo de que a atividade da ADA, responsável pela metabolização dessa molécula em inosina (DA CUNHA, 1991), mostrou-se reduzida, possivelmente objetivando a manutenção da sua concentração e consequente inibição do receptor P2Y12, proporcionando atividade antitumoral, no sentido de prevenir a metastização associada a esse receptor, e antitrombótica, uma vez que reduz a ativação e agregação plaquetárias.

Muitos estudos já demonstraram que a atividade da ADA está alterada em diferentes tipos de cânceres, bem como insuficiente nas células linfóides em imunodeficiências congênitas severas (DA CUNHA, 1991) e hiperativa nas doenças autoimunes, reduzindo as funções supressoras da adenosina (GAO et al., 2021). Maldonado e colaboradores (2008) analisaram a atividade da ADA nas plaquetas de pacientes com NIC III e CCU sem tratamento ou após conização ou radioterapia, verificando que naquelas tratadas previamente houve uma diminuição da atividade da enzima, entretanto, a comparação entre controles e não tratadas não apresentou diferença significativa. Além disso, em outro estudo foi relatado aumento da atividade da ADA em plaquetas de pacientes com LSIL frente à HSIL, controles e portadoras de CCU (MALDONADO et al., 2012). Apesar disso, o papel da ADA no contexto tumoral ainda não foi estabelecido, havendo divergências quanto à sua expressão em diferentes tipos de neoplasia e células (BATTISTI et al., 2013).

Ainda que a adenosina seja capaz de reduzir a ativação e agregação plaquetárias através da inibição do receptor P2Y₁₂ e, assim, evitar a ocorrência de metástases, seu papel na carcinogênese é mais pronunciado como molécula indutora de imunossupressão local, pela produção de IL-10 e TGF- β . Outrossim, estudos relataram diversos mecanismos que associam a ativação das plaquetas à estimulação da resposta imune inata e adaptativa, tais quais liberação de mediadores inflamatórios, formação de agregados plaqueta-leucócito e interação com células apresentadoras de antígenos (APCs) (GACHET; HECHLER, 2020). Nesse sentido, foi demonstrado que fármacos antagonistas do receptor P2Y₁₂, como Ticagrelor, foram capazes de inibir a exposição e liberação de CD40L pelas plaquetas, responsável pela interação com CD40 das APCs, e reduzir os níveis de proteína-C reativa, um marcador de resposta inflamatória (CATTANEO, 2015; MANSOUR et al., 2020). Nesse sentido, no contexto das NICs, a adenosina pode favorecer a inibição da resposta imune pela sua interação com a ativação plaquetária, uma vez que age de maneira semelhante ao Ticagrelor.

Em contraste com o efeito imunossupressor proposto para a adenosina, Gao e colaboradores (2016) mostraram que o tratamento de células de CCU com a molécula diminuiu significativamente as atividades de migração e invasão, iniciando um processo apoptótico. Mello e colaboradores (2014) indicaram que o efeito citotóxico proporcionado pelo ATP em linhagens celulares de CCU ocorreu principalmente devido à ação da adenosina no receptor P2X₇, não expresso por plaquetas. Tendo em vista que o efeito da adenosina diverge a depender do receptor ativado e do tipo de célula cancerígena e que poucos estudos avaliaram a expressão das ectonucleotidases e ADA em plaquetas, levantamos a necessidade de novos estudos para esclarecer com exatidão a função dessas moléculas no desenvolvimento do câncer ginecológico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As lesões intraepiteliais cervicais, assim como o CCU, são processos patológicos relevantes para a saúde feminina, uma vez que acometem grande parcela da população, principalmente em países subdesenvolvidos. Dessa forma, demonstra-se que é necessário melhor entendimento acerca dos processos envolvidos na sua patogênese e desenvolvimento. Os dados obtidos em nosso estudo sustentam a hipótese de que ocorre extensa metabolização de nucleotídeos de adenina no microambiente das lesões intraepiteliais cervicais, decorrente da superexpressão de nucleotidases, proposta previamente em estudos com linhagens de células tumorais do colo uterino. Por conseguinte, tais achados corroboram para um entendimento de que o nucleosídeo adenosina, produto da degradação de ATP, ADP e AMP e importante molécula sinalizadora na ocorrência de processos imunossupressores e promotores de progressão tumoral, apresenta-se em grandes concentrações nas pacientes com HSIL. Nosso estudo demonstrou que ocorre, ainda, alteração na expressão de enzimas do sistema purinérgico nas plaquetas de pacientes com diagnóstico citopatológico de NIC em comparação a controles saudáveis, possivelmente no sentido de evitar processos trombóticos, uma vez que o ADP é um importante ligante na indução de ativação e agregação plaquetárias e a adenosina fisiologicamente inibe sua interação com receptores P2Y. No mesmo sentido, a redução da atividade da ADA, responsável por metabolizar a adenosina, corrobora com o fato de sua concentração estar aumentada. Apesar disso, ainda não há consenso quanto à atuação das plaquetas nos processos imunitários e na facilitação da progressão tumoral e emissão de metástases. Dessa forma, observamos a necessidade de novos estudos para elucidação do seu papel no contexto das NIC e das influências que o desequilíbrio na sinalização purinérgica em pacientes portadoras dessas lesões podem ocasionar nessas células.

REFERÊNCIAS

- ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, jun. 2013.
- BAHREYNI, A. et al. Adenosine: An endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2715–2722, abr. 2018.
- BALLERINI, P. et al. P2Y12 Receptors in Tumorigenesis and Metastasis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2 fev. 2018.
- BATTISTI, V. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 3, abr. 2013.
- BECKENKAMP, A. et al. Ectonucleotidase expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. **Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire**, v. 92, n. 2, p. 95–104, abr. 2014.
- BHATLA, N.; SINGHAL, S. Primary HPV screening for cervical cancer. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 65, p. 98–108, maio 2020.
- BONCLER, M. et al. Adenosine receptor agonists deepen the inhibition of platelet aggregation by P2Y 12 antagonists. **Vascular Pharmacology**, v. 113, fev. 2019.
- BRADFORD, M. 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, p. 248–254, maio 1976.
- BRUNI L. et al. ICO/IARC Information Center on HPV and Cancer (HPV Information Center). **Human Papillomavirus and Related Diseases in the World**. Summary Report, 2019.
- BRASIL. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 1, p. 157–187, mar. 2014.
- CAMPION, M.; CANFELL, K. Cervical Cancer Screening and Preinvasive Disease. In: BEREK, J.; HACKER, N. F. (Eds.). **Gynecologic Oncology**. 6. ed. Filadélfia: Wolters Kluwer, p. 242–325, 2015.
- CATTANEO, M. The platelet P2 receptors in inflammation. **Hamostaseologie**, v. 35, n. 3, p. 262–266, 2015.
- CHEN, L. et al. Integrated analysis of HPV-mediated immune alterations in cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 149, n. 2, p. 248–255, 2018.

CIMPEAN A, et al. Substratespecifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. **Biochemical Journal**, v. 381, p. 71-77, 2004.

DA CUNHA S. J. G. A adenosina desamina. Uma enzima pluridisciplinar. **Acta Médica Portuguesa**, v.4, p.3 15–323, 1991.

DE LOURDES MORA-GARCÍA, M. et al. Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. **Cellular Immunology**, v. 320, p. 46–55, out. 2017.

DE LOURDES MORA-GARCÍA, M. et al. HPV-16 Infection Is Associated with a High Content of CD39 and CD73 Ectonucleotidases in Cervical Samples from Patients with CIN-1. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 5 jul. 2019.

DE LOURDES MORA-GARCÍA, M. et al. Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 302, 26 out. 2016.

DELLAS, A. et al. Angiogenesis in cervical neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. **Gynecologic Oncology**, v. 67, n. 1, out. 1997.

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

FERNANDES, C. J. et al. Cancer-associated thrombosis: the when, how and why. **European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society**, v. 28, n. 151, p. 180119, 31 mar. 2019.

FERRARI, D.; MALAVASI, F.; ANTONIOLI, L. A Purinergic Trail for Metastases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 3, p. 277–290, mar. 2017.

FRANCO, A. T.; CORKEN, A.; WARE, J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. **Blood**, v. 126, n. 5, p. 582–588, 30 jul. 2015.

FUENTES, E. et al. Inhibition of platelet activation and thrombus formation by adenosine and inosine: studies on their relative contribution and molecular modeling. **PloS One**, v. 9, n. 11, 13 nov. 2014.

GACHET, C.; HECHLER, B. Platelet Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. **Hamostaseologie**, v. 40, n. 2, maio 2020.

GAO, Z.-W. et al. Adenosine inhibits migration, invasion and induces apoptosis of human cervical cancer cells. **Neoplasia**, v. 63, n. 2, 2016.

GAO, Z.-W. et al. CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, 15 fev. 2017.

GAO, Z.-W. et al. The roles of adenosine deaminase in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 20, n. 1, p. 102709, jan. 2021.

GARCÍA-ROCHA, R. et al. Cervical cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1. **Cytokine**, v. 118, p. 71–79, jun. 2019.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Colorimetric method. In: **Bergmeyer HU**, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: VerlagChemie; 1984. p. 315–23.

GLOBOCAN. **Cancer Today**, 2021. Disponível em: <goo.gl/bAF5o5>. Acesso em: 02 jul. 2022.

GUTIERREZ V, et al. High expression of Ecto-nucleotidases CD39-CD73, A2A-A2B adenosine receptors and IL-10 is associated with HLA class I downregulation in advanced cervical cancer. **Mediators of Inflammation**, vol. 2014

HASHIKAWA, T. et al. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 1, p. 131–133, jan. 2004.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 33–39, jan. 2004.

HOLINSTAT, M. Normal platelet function. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 2, p. 195–198, 1 jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 118, n. 6, p. 1481–1495, mar. 2006.

JERONIMO, J. et al. Secondary Prevention of Cervical Cancer: ASCO Resource-Stratified Clinical Practice Guideline. **Journal of Global Oncology**, v. 3, n. 5, 10 dez. 2016.

JOHNSTON-COX, H. A.; RAVID, K. Adenosine and blood platelets. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 3, p. 357, set. 2011.

KEPP, O. et al. ATP and cancer immunosurveillance. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 40, n. 13, 7 jan. 2021.

KIM, A. S.; KHORANA, A. A.; MCCRAE, K. R. Mechanisms and biomarkers of cancer-associated thrombosis. **Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 225, p. 33–53, nov. 2020.

KIM, S.; KUNAPULI, S. P. P2Y12 receptor in platelet activation. **Platelets**, v. 22, n. 1, p. 56–60, 2011.

KOUPENOVA, M. et al. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. **Circulation Research**, v. 122, n. 2, p. 337–351, 19 jan. 2018.

KUNAPULI, S. P. et al. Platelet purinergic receptors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 175–180, abr. 2003.

LIU, C. et al. CD73 promotes cervical cancer growth via EGFR/AKT1 pathway. **Translational Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1089–1098, maio 2022.

LOOPIK, D. L. et al. The risk of cervical cancer after cervical intraepithelial neoplasia grade 3: A population-based cohort study with 80,442 women. **Gynecologic Oncology**, v. 157, n. 1, abr. 2020.

MALAGÓN, T. et al. Cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia for women with normal cytology but positive for human papillomavirus: Systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 10, p. 2695–2707, 15 nov. 2020.

MALDONADO, P. A. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 6, abr. 2008.

MALDONADO, P. A. 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, set. 2010.

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

MANNINO, M. H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, 28 out. 2015.

MANSOUR, A. et al. P2Y12 Inhibition beyond Thrombosis: Effects on Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. E1391, 19 fev. 2020.

MATTOS, P.S.M.S. Frequência de neoplasia intraepitelial cervical nas pacientes que realizaram exame de papanicolau atendidas no sistema único de saúde na Bahia. **Rev. Eletrôn. Atualiza Saúde**, v. 3, n. 3, p. 07-14, jan./jun. 2016.

MELLO, P. DE A. et al. Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 19, p. 2905–2918, 1 out. 2014.

MERIGHI, S. et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 100, n. 1, p. 31–48, out. 2003.

MORELLO, S. et al. Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2223, 27 ago. 2021.

MUKAI, M.; OKA, T. Mechanism and management of cancer-associated thrombosis. **Journal of Cardiology**, v. 72, n. 2, p. 89–93, ago. 2018.

MUÑOZ-GODÍNEZ, R. et al. Detection of CD39 and a Highly Glycosylated Isoform of Soluble CD73 in the Plasma of Patients with Cervical Cancer: Correlation with Disease Progression. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, p. 1678780, 2020.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Pap Test and Bethesda 2014: “The reports of my demise have been greatly exaggerated. (after a quotation from Mark Twain)”. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 19, n. 3, p. 175–184, jul. 2015.

OURY, C. et al. The platelet ATP and ADP receptors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 7, p. 859–875, 2006.

PALACIOS-ACEDO, A. L. et al. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1805, 2019.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, n. 4, 1996.

REYNA-JELDES, M. et al. Autocrine and paracrine purinergic signaling in the most lethal types of cancer. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 3, p. 345–370, set. 2021.

SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O’GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **The Journal of experimental medicine**, v. 217, n. 1, 1 jun. 2020.

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

TORRES-PINEDA, D. B. et al. Adenosine augments the production of IL-10 in cervical cancer cells through interaction with the A2B adenosine receptor, resulting in protection against the activity of cytotoxic T cells. **Cytokine**, v. 130, p. 155082, 4 abr. 2020.

WHO. **Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem**. Geneva: World Health Organization; 2020.

WHO. International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report 2008**. Lyon: World Health Organization, 2008.

WRIGHT, J. R. et al. The TICONC (Ticagrelor-Oncology) Study: Implications of P2Y12 Inhibition for Metastasis and Cancer-Associated Thrombosis. **Journal of the American College of Cardio Oncology**, v. 2, n. 2, p. 236–250, jun. 2020.