

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

**ISABELLA MARTINS VIEIRA DIAS  
LUCAS DALMOLIN LOVATTO**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE COMPONENTES DO SISTEMA  
PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS DE MULHERES COM DIABETES MELLITUS  
TIPO 2 E MULHERES SAUDÁVEIS**

**CHAPECÓ  
2022**

**ISABELLA MARTINS VIEIRA DIAS**

**LUCAS DALMOLIN LOVATTO**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE COMPONENTES DO SISTEMA  
PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS DE MULHERES COM DIABETES MELLITUS  
TIPO 2 E MULHERES SAUDÁVEIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Cardoso

Coorientadora: Profa. Dra Daniela Zanini

**CHAPECÓ**

**2022**

## **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Dias, Isabella Martins Vieira; Lovatto, Lucas Dalmolin  
ANÁLISE DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE COMPONENTES DO  
SISTEMA PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS DE MULHERES COM  
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E GRUPO CONTROLE / Isabella  
Martins Vieira Dias. -- 2022.  
18 f.:il.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Cardoso  
Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Zanini  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Medicina, Chapecó,SC, 2022.

1. diabetes mellitus tipo 2. 2. sistema purinérgico.  
3. inflamação. 4. linfócitos. I. Cardoso, Andréia  
Machado, orient. II. Zanini, Daniela, co-orient. III.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

**ISABELLA MARTINS VIEIRA DIAS  
LUCAS DALMOLIN LOVATTO**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE COMPONENTES DO  
SISTEMA PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS DE MULHERES COM  
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E MULHERES SAUDÁVEIS**

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 Andréia Machado Cardoso  
Coorientadora: Professora Dr.ª Daniela Zanini**

Este trabalho de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 26/08/2022

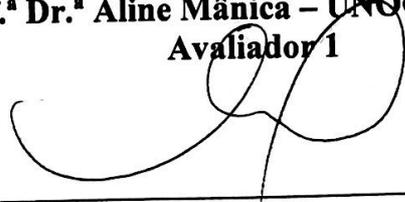
**BANCA EXAMINADORA**



**Prof.ª Dr.ª Daniela Zanini – UFFS  
Coorientadora**



**Prof.ª Dr.ª Aline Mânica – UNOCHAPECÓ  
Avaliador 1**

  
**Médica Marielle Lang Makiyama  
Avaliador 2**

# ANÁLISE DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE COMPONENTES DO SISTEMA PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS DE MULHERES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 E MULHERES SAUDÁVEIS

Isabella Martins Vieira Dias<sup>\*</sup>  
Lucas Dalmolin Lovatto<sup>\*\*</sup>  
Daniela Zanini<sup>\*\*\*</sup>  
Andréia Machado Cardoso<sup>\*\*\*\*</sup>

## RESUMO

Atualmente, a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma epidemia global, acometendo principalmente mulheres acima de 40 anos, sugerindo que fatores como obesidade, sedentarismo e vias pró-inflamatórias da sinalização purinérgica estão associados à sua causa, provocando inflamação crônica. O trabalho consistiu na análise da atividade e expressão de componentes do sistema purinérgico em linfócitos de mulheres com DM2 e mulheres saudáveis. Participaram do estudo mulheres de 40 a 60 anos, diagnosticadas com DM2 (n=24) e saudáveis (n=28). Após coleta sanguínea realizou-se ensaios enzimáticos para identificação de componentes do sistema purinérgico. Os níveis do nucleotídeo trifosfato de adenosina (ATP) extracelular foram determinados no soro enquanto a atividade das enzimas NTPDase e ADA foram analisadas em linfócitos. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$  e todas as análises foram realizadas no programa *GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA)*. Os achados do estudo demonstraram aumento dos níveis ATP extracelular e da atividade das enzimas NTPDase e ADA ( $p < 0,05$ ) expressas em linfócitos de mulheres com DM2 quando comparadas com mulheres saudáveis. Esses resultados demonstram a correlação dos níveis de ATP extracelular, NTPDase e ADA com a inflamação característica da DM2 e apontam sua influência na regulação dos mecanismos imunológicos, demonstrando sua importância como possíveis marcadores prognósticos e alvos terapêuticos.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2; sistema purinérgico; inflamação; linfócitos.

<sup>\*</sup> Acadêmica do Curso de Medicina. Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: isamvdias@gmail.com

<sup>\*\*</sup> Acadêmico do Curso de Medicina. Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: lovatto.lucas@gmail.com

<sup>\*\*\*</sup> Docente do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas. E-mail: daniela.zanini@uffs.edu.br

<sup>\*\*\*\*</sup> Docente do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas. E-mail: andreia.cardoso@uffs.edu.br

## 1 INTRODUÇÃO

A diabetes tem assumido proporções globais alarmantes, sendo uma das emergências de saúde com avanço mais rápido na população e, conforme estimativas da *International Diabetes Federation* (2022), há aproximadamente 537 milhões de adultos vivendo com essa condição, de modo que a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é responsável por mais de 90% dos casos. Nesse cenário, o Brasil se apresenta como o sexto país com maior número de pessoas diagnosticadas com DM2. Além disso, há prevalência de DM2 elevada entre mulheres, principalmente com idade acima de 30 anos, tendo como justificativa a associação com alterações hormonais, sedentarismo e sobrepeso, fatores que colocam esse como um grupo de risco e destacam a importância de ser estudado (MALTA *et al.*, 2019).

O DM2 é uma condição expressa por deficiência de secreção da insulina em decorrência da disfunção das células  $\beta$  pancreáticas bem como resistência periférica à insulina, com influência de fatores genéticos e ambientais como sedentarismo, obesidade e dietas hipercalóricas (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017). Ademais, há forte correlação entre a resistência insulínica e obesidade com um processo de ativação crônica de vias pró-inflamatórias em células imunes e do tecido adiposo, marcado pela expressão de marcadores inflamatórios, o que confere a característica de inflamação crônica de baixo grau na progressão da doença (LONTCHI-YIMAGOU *et al.*, 2013). A regulação dos níveis dos marcadores inflamatórios séricos desse estado pelas células imunes é influenciada diretamente pela sinalização purinérgica, um sistema complexo de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares (YEGUTKIN, 2014).

O sistema purinérgico engloba as funções desempenhadas por nucleotídeos de purina, trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e o nucleosídeo adenosina enquanto moléculas de sinalização extracelular, estando associadas à modulação da homeostase do organismo, bem como ao desenvolvimento de processos patológicos (BURNSTOCK; NOVAK, 2013; BURNSTOCK, 2017). Outras moléculas inseridas nesse sistema de sinalização são os receptores P1 (adenosina) e P2 (ATP e ADP), e enzimas conhecidas como ectonucleotidases, como a ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase), a ecto-5 nucleotidase e adenosina deaminase (ADA) (BURNSTOCK; NOVAK, 2013; LAMMERS *et al.*, 2020).

No DM2, a ação dos componentes purinérgicos deflagram respostas relacionadas ao funcionamento pancreático, bem como de outros órgãos e tecidos envolvidos na fisiopatologia dessa doença, e à ativação, proliferação e maturação de células imunológicas envolvidas na

inflamação crônica de baixo grau (BURNSTOCK; NOVAK, 2013; BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014; GUZMAN-FLORES *et al.*, 2015).

O ATP é um mediador pró-inflamatório, que, quando em níveis aumentados, relaciona-se a processos patológicos que elevam sua liberação no meio extracelular, como em lesão tecidual e reações inflamatórias, dentre outros (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014). Sua estimulação nos linfócitos geralmente está associada à ativação, sobrevivência e proliferação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e facilitam a migração transendotelial destes para o tecido sob processo inflamatório (TRABANELLI *et al.*, 2012).

Porém, níveis extremamente elevados de ATP podem induzir um processo apoptótico dos linfócitos T mediados pelos receptores P2X4 e P2X7, além de estimular a proliferação e recrutamento de células T reguladoras, indicando que diferentes níveis de ATP podem desencadear diferentes respostas imunológicas (TRABANELLI *et al.*, 2012). Tais achados correspondem a alterações observadas *in vitro*, carecendo de estudos que analisem a relação entre ATP e os linfócitos *in vivo*.

O controle dos níveis desse ATP extracelular é realizado por uma rede de enzimas que inclui a família NTPDase que age especificamente sobre os substratos de ATP e ADP realizando sua hidrólise e aumentando os níveis de AMP, de modo que a expressão da NTPDase na membrana celular de linfócitos está relacionada com a modulação do sistema imune e respostas inflamatórias na presença de estresse celular (YEGUTKIN, 2014).

Em uma situação de estresse celular, o AMP formado pode ser convertido pela ação da ecto-5'-nucleotidase com a formação e liberação de adenosina extracelular. Essa molécula possui função sinalizadora e interage com receptores específicos acoplados à proteína G presentes na superfície de diversas células, sendo eles identificados como A1, A2A, A2B e A3. Dentre suas funções, a adenosina tem importante função na modulação dos processos de origem inflamatória, realizando um papel anti-inflamatório e de contenção de dano tecidual (BLACKBURN *et al.*, 2009; ANTONIOLI *et al.*, 2019).

A adenosina possui função de regulação imunológica anti-inflamatória, que ocorre principalmente por meio dos receptores A2A, impedindo a ativação de linfócitos T e, conseqüentemente, inibindo a produção de IL-4 e IFN- $\gamma$  pelos linfócitos CD4<sup>+</sup> imaturos ou efetoras Th1 e Th2, de IL-2 pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e na manutenção do equilíbrio entre linfócitos T foliculares dos tipos efetores e reguladores (ANTONIOLI *et al.*, 2019). Ainda, a adenosina é capaz de inibir a ativação induzida por meio dos *toll like receptors* (TLR) nos linfócitos imaturos (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014). Já nos linfócitos T reguladores, por meio também dos receptores A2A, a adenosina desempenha um papel estimulatório da

proliferação dessa linhagem celular (ANTONIOLI *et al.*, 2019). A partir disso, as células T reguladoras em maior quantidade induzem uma resposta anti-inflamatória a partir da liberação de IL-10, citocina imunossupressora, além de promoverem a conversão de nucleotídeos extracelulares a adenosina, que se liga nos linfócitos T reguladores, resultando em um ciclo que induz ainda mais imunossupressão (ANTONIOLI *et al.*, 2019; LAMMERS *et al.*, 2020).

Capaz de degradar a adenosina a inosina, a adenosina deaminase (ADA) tem seus níveis plasmáticos aumentados em resposta a altos níveis de adenosina, participando do processo modulatório do sistema imunológico (PASSOS *et al.*, 2018). A expressão e atividade da ADA relacionam-se diretamente ao grau de inflamação, em que níveis altos dessa enzima são encontrados em situação de estresse oxidativo e dano celular (NIRAULA *et al.*, 2018; CAO *et al.*, 2021). Além disso, a ADA exibe relação com o aumento da secreção de insulina e a diminuição da sensibilidade a ela nos tecidos, bem como a função das células  $\beta$  pancreáticas (CAO *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi compreender a relação entre esses componentes da sinalização purinérgica em linfócitos de mulheres com DM2 quando comparadas com mulheres saudáveis para identificar alterações relevantes no grupo diabético e ensejar novas propostas terapêuticas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

A pesquisa possui delineamento quantitativo e caracteriza-se como um estudo caso-controle experimental de corte transversal do tipo comparativo. A população do estudo consiste em mulheres sedentárias entre 40 e 60 anos de idade com diagnóstico de DM2 e mulheres na mesma faixa etária sedentárias saudáveis, ambas residentes no município de Chapecó, Santa Catarina.

A amostra foi calculada pela utilização do programa G\*Power. O alpha foi estabelecido em 0,05, o poder do teste em 0,80 e o tamanho do efeito foi estimado a partir de um estudo anterior (LAMMERS *et al.*, 2020) que investigou variáveis semelhantes do sistema purinérgico em linfócitos sanguíneos. O tamanho amostral estimado foi de 38, sendo dividido em dois grupos: grupo diabético (GD, n=19) composto por mulheres com DM2 e grupo controle (GC, n=19), composto por mulheres saudáveis.

A amostra inicial do estudo continha 67 participantes (35 GD e 35 GC), porém 8 mulheres em cada grupo não compareceram ao dia da coleta sanguínea. Em ambos os grupos foram considerados critérios de exclusão fazer uso de medicamentos que pudessem interferir nos resultados do estudo, exceto os habituais para o tratamento da DM2, além de ser portadora de outra patologia crônica ou aguda além da DM2. Assim, após aplicação dos critérios de exclusão a amostra final do GD ficou composta por 24 mulheres na faixa etária entre 40 e 60 anos, com DM2 clinicamente comprovada, e uso de fármacos antidiabéticos conforme orientação médica enquanto para o GC permaneceram 28 mulheres na faixa etária entre 40 e 60 anos que não possuíam nenhuma doença ou fizeram uso de qualquer medicamento. Ambos os grupos foram compostos por mulheres de diferentes etnias, com predomínio de brancas e oriundas de diversos bairros de Chapecó - SC (Brasil). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob protocolo número 4.598.914.

## 2.2 COLETA DE SANGUE

As participantes foram submetidas, após um jejum de 12 horas, a uma coleta de 20 ml de sangue periférico por punção venosa. Foram coletados 20 ml de sangue total em tubos *vacutainer* com EDTA. O material coletado foi enviado aos laboratórios de pesquisa da UFFS/Campus Chapecó, onde foi processado e armazenado. As amostras de sangue separadas em linfócitos e soro foram congeladas em freezer a -80°C para as posteriores análises.

## 2.3 DADOS HEMODINÂMICOS E ANTROPOMÉTRICOS

O peso e altura foram determinados por uma balança e um estadiômetro, respectivamente. Para verificar a pressão arterial e frequência cardíaca foi utilizado um monitor automático de pressão arterial (Omron HEM-742INT).

## 2.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS E GLICÊMICOS

Para a análise da expressão proteica por meio do método de Western-blot os linfócitos do sangue periférico foram adicionados ao tampão de lise RIPA e homogeneizados em microtubo com auxílio de esferas de vidro. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos a 40°C. Após a determinação do conteúdo proteico (BRADFORD, 1976), 25 ug de proteínas do sobrenadante foram adicionadas ao tampão Laemmli 2X e submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma

membrana do tipo PVDF por 2 horas em tanque. Em seguida, a membrana foi bloqueada em leite 5% por 1 hora e lavada por 3X em TBS-T. Por último será incubada com o anticorpo primário a 4°C *overnight* (NTPDase, ADA).

A atividade da NTPDase em linfócitos foi determinada segundo Leal et al. (2005), cujo método consiste na avaliação da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado mediante ensaio colorimétrico. O meio de reação foi composto de NaCl 1.2 milimol por litro (mmol/L), Glicose 600 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 500 mmol/L pH 8.0, CaCl<sub>2</sub> 5 mmol/L com ajuste dos valores para um volume final de 160 microlitros (µL) para formação do sistema de incubação. Ao meio de reação foram adicionados 20 µL de linfócitos suspensos em solução salina fisiológica e pré-incubados por 10 min a 37°C.

Na sequência da adição do substrato (ATP ou ADP) e interrupção da reação com ácido tricloroacético a 10%, o fosfato inorgânico liberado foi testado conforme descrito por Chan *et al.* (1986) usando verde malaquita como reagente colorimétrico e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como padrão. Após realização do cálculo do fator de correção da curva de fosfato coloriu-se as amostras com 300 µL de verde malaquita e foram lidas em 630 nanômetros (nm). As análises foram realizadas em duplicatas e a atividade específica é expressa em nanomol (nmol) de fosfato inorgânico (Pi) liberado por minuto por miligrama (min/mg) de proteína.

A atividade da enzima ADA em linfócitos foi estabelecida seguindo o protocolo descrito por Giusti e Galanti (1984). Utilizou-se 50 µL de linfócitos para reação com 21 mmol/L de adenosina pH 6,5, incubados a 37°C por 60 minutos. Essa técnica objetiva a produção direta de amônia a partir da degradação da adenosina pela ADA, com a formação de um complexo colorido de indofenol, quantificado espectrofotometricamente sob leitura em 620 nm. O teor de proteína para o experimento foi ajustado na faixa de 0,7-0,9 miligramas por litro (mg/mL) e os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L).

Para a determinação dos níveis do nucleotídeo de ATP no soro do GD e GC, fez-se uso do kit comercial de ensaio de bioluminescência com luciferase de vaga-lume recombinante e seu substrato D-luciferina (KARAMOHAMED; GUIDOTTI, 2001).

A glicemia de jejum dos grupos foi determinada por meio de medidor de glicemia sanguínea da marca On Call® Plus II, cujo resultado é definido em miligramas por decilitro (mg/dL).

Por fim, os níveis de HbA1c foram dosados por meio do envio da amostra a um laboratório terceirizado, que realizou as análises por meio de turbidimetria, com resultados estabelecidos em %, seguindo método certificado pelo National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP).

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, que apresentaram distribuição normal. Os outliers, foram analisados e removidos apenas para a análise das variáveis que se diferenciavam dos demais dados. Os dados estão apresentados em média e desvio padrão. Para analisar a diferença entre os dois grupos (GD e GC) foi utilizado o teste T não paramétrico. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$  e todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

## 3 RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentados os dados referentes à caracterização da amostra bem como parâmetros hemodinâmicos e glicêmicos. A idade média das participantes no GD foi de  $51 \pm 6,60$  e a altura média foi de  $1,57 \pm 0,04$ , enquanto no GC a média da idade foi de  $50,22 \pm 6,43$  e a da altura foi de  $1,60 \pm 0,06$ . Na comparação entre os dois grupos não houve aumento ou diminuição significativamente estatística em relação às variáveis peso, frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD). Todavia, constatou-se, em relação ao perfil glicêmico, aumento dos valores de glicemia sérica e hemoglobina glicada (HbA1c) no GD em comparação com o GC.

Tabela 1 – Caracterização da amostra

Variável	GD	GC	p-valor
<b>Idade</b>	51 ± 6,60	50,22 ± 6,43	-
<b>Altura</b>	1,57 ± 0,04	1,60 ± 0,06	-
<b>Peso (kg)</b>	78,35 ± 15,88	77,31 ± 13,32	0,7984
<b>FC (bpm/min)</b>	83,25 ± 8,70	78,93 ± 7,89	0,0687
<b>PAS (mmHg)</b>	128 ± 12,61	124,9 ± 10,41	0,3350
<b>PAD (mmHg)</b>	80,88 ± 7,78	77,07 ± 7,17	0,0727
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	132,6 ± 30,90	90,36 ± 9,94	0,0001
<b>HbA1c (%)</b>	6,30 ± 0,67	5,414 ± 0,31	0,0044

Fonte: elaborada pelos autores (2022).

**Tabela 1** Idade, altura, peso, parâmetros hemodinâmicos e glicêmicos do grupo diabético e grupo controle (saudável). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. FC, PAS, PAD: GD - (n=24) e GC - (n=27); Glicemia: GD - (n=23) e GC - (n=28); HbA1c: GC - (n=7) e GD - (n=12). GD: grupo diabético; GC = grupo controle; FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; kg: quilograma; bpm/min: batimentos por minuto; mmHg: milímetros de mercúrio; HbA1c: hemoglobina glicada.

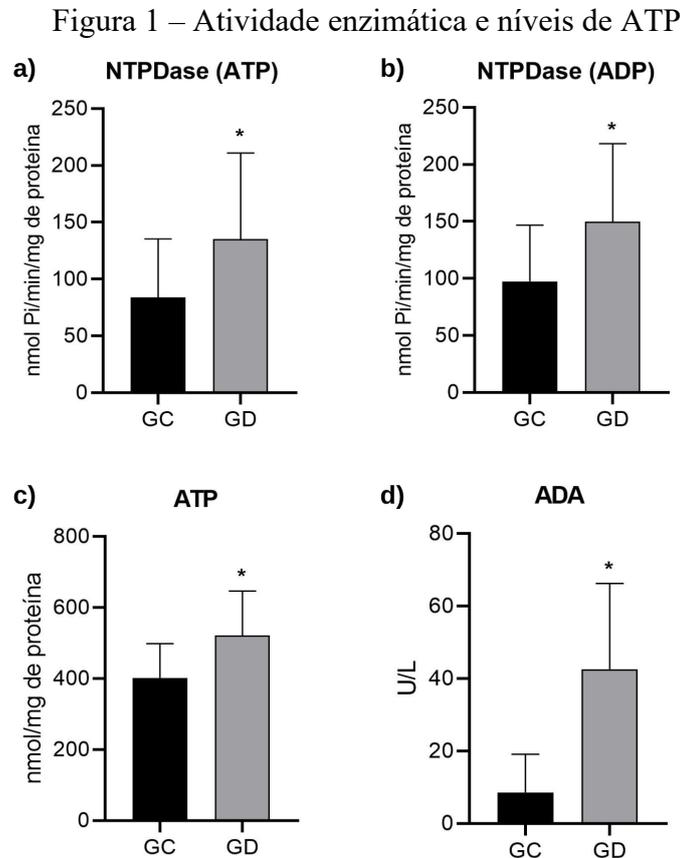
Em relação às medicações em uso para o controle da diabetes pelo GD foi verificado que 14 participantes utilizam metformina (66,66%), 5 usam gliclazida + metformina (23,81%), 6 usam insulina Aspart-Glargina (9,52%) e apenas uma faz uso de gliclazida (4,76%), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Medicamentos antidiabéticos tomados pelo grupo diabético

Medicamento	Nº de participantes	Porcentagem (%)
Metformina (Biguanida)	14	66,66%
Gliclazida + metformina	5	23,81%
Insulina (Aspart-glargina)	2	9,52%
Gliclazida (Sulfonilureias)	1	4,76%

Fonte: elaborada pelos autores (2022).

Os resultados de atividade enzimática e dos níveis de ATP encontrados em ambos GC e GD estão representados na Figura 1.



Fonte: elaborada pelos autores (2022).

**Fig. 1** Atividade enzimática e níveis de ATP. a Atividade da NTPDase em linfócitos utilizando ATP como substrato nos GC (n = 23) e GD (n = 20). b Atividade da NTPDase em linfócitos utilizando ADP como substrato nos GC (n = 23) e GD (n = 20). c Dosagem dos níveis em soro de ATP nos GC (n = 27) e GD (n = 24). d Dosagem de ADA nos linfócitos nos GC (n = 13) e GD (n = 13). As colunas estão representadas como média  $\pm$  desvio padrão. \*p < 0.05 vs. GC.

A média e desvio padrão dos GC e GD, respectivamente, em cada análise foi a seguinte: 1) NTPDase (ATP) [83.95  $\pm$  51,30 (n = 23) vs. 135,3  $\pm$  75,67 (n = 20) nmol Pi/min/mg de proteína]; 2) NTPDase (ADP) [97,31  $\pm$  49,53 (n = 23) vs. 150  $\pm$  68,35 (n = 20) nmol Pi/min/mg de proteína]; 3) ATP [401.5  $\pm$  96.80 (n = 27) vs. 521.4  $\pm$  124.7 (n = 24) nmol/mg de proteína]; 4) ADA [8.588  $\pm$  10.51 (n = 13) vs. 42.55  $\pm$  23.70 (n = 13) U/L].

A análise da atividade da enzima NTPDase, tendo o ATP como substrato, revelou que houve maior hidrólise de ATP no GD quando comparado ao GC (Fig. 1a, p < 0,05), tendo o mesmo ocorrido na hidrólise do ADP, este enquanto substrato (Fig 1b, p < 0,05). Além disso, os níveis de ATP também se encontravam aumentados no GD em relação ao GC (Fig. 1c,

$p < 0,05$ ), e tal padrão repetiu-se na análise da atividade da ADA, em que esta estava aumentada, de forma significativa, no GD (Fig 1d,  $p < 0,05$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

A DM2 é uma doença conhecida por ter como características principais resistência periférica à insulina, com diminuição da função das células  $\beta$  pancreáticas em associação a um processo pró-inflamatório de baixo grau (BURNSTOCK; NOVAK, 2013). Nesse contexto, componentes do sistema purinérgico como o ADP e ATP extracelular e a adenosina participam na regulação do estado inflamatório e imunológico da DM2 por meio de sua interação com receptores purinérgicos, bem como pela degradação por vias enzimáticas que incluem a NTPDase e a ADA (LIMA *et al.*, 2022). Além disso, segundo estudos prévios um defeito na ação da insulina nos linfócitos T pode estar associado à alteração imunológica crônica evidenciada no DM2 (STENTZ; KITABCHI, 2003).

Considerando a importância do ATP extracelular na patogênese, progressão e como possível marcador inflamatório, nosso estudo é pioneiro em apresentar a sua dosagem em pacientes com DM2. Nossos resultados apontaram aumento dos níveis do ATP extracelular no GD em comparação com o GC. Esses elevados níveis extracelulares no GD têm como consequência e são indicativos de um estado pró-inflamatório vigente e de uma secreção deficiente de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas bem como sensibilidade periférica à insulina (GARCIA-JACOBO *et al.*, 2022).

Reforçando essa possível associação com o contexto pró-inflamatório, a literatura apresenta previamente outras condições em que há aumento do ATP extracelular simultâneo a um estado pró-inflamatório exacerbado. Essa mesma associação foi vista em pacientes hipertensas no estudo de Lammers *et al.*, (2020), bem como representando um potente padrão de resposta molecular ao dano endotelial em sítios tumorais (KOBAYASHI *et al.*, 2022; QIAN *et al.*, 2016).

Além disso, como resultado, também foi evidenciado aumento da atividade das enzimas NTPDase em linfócitos tanto na hidrólise de ATP quanto de ADP como substrato no GD. O padrão de expressão da enzima NTPDase em linfócitos foi previamente descrito como um marcador de ativação amplamente expresso em subconjuntos de células T ativadas e células NK (FERRERO; FAINI; MALAVASI, 2019). Logo, sua aumentada atividade no GD de nosso estudo pode ser indicativa da presença do estado de inflamação crônica de baixo grau persistente mediado por aumento de células ativadas em pacientes com DM2 (GARCÍA-

HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Outros estudos, como o de García-Hernández *et al.* (2011) corroboram com os achados ao terem identificado atividade aumentada da NTPDase em células mononucleares do sangue periférico, além de correlação positiva com níveis de Hb1Ac e glicemia de jejum. No estudo de Guzman-Flores *et al.* (2015) observou-se que a expressão de NTPDase estava significativamente aumentada em linfócitos totais e no subtipo CD4+ de pacientes com DM2 quando comparada ao grupo controle.

Outro ponto a se destacar seria o aumento associado entre a enzima NTPDase e os níveis de ATP extracelular. Diante dos elevados níveis de ATP extracelular, esse aumento da atividade da NTPDase em pacientes com DM2 pode ser visto como uma resposta compensatória do organismo às altas concentrações de ATP no meio extracelular, tendo também como consequência a geração de adenosina (LIMA *et al.*, 2022). De forma similar Lammers *et al.*, (2020) identificou aumento concomitante da atividade da NTPDase utilizando ATP como substrato e do ATP extracelular.

Há também que se apontar que o ATP extracelular ativa sua via de degradação pelas NTPDases (PASSOS *et al.*, 2018), e sua degradação gera adenosina, molécula que apresenta função regulatória anti-inflamatória, em que realiza uma inibição dos linfócitos T CD4+ e efetores e estimulação dos linfócitos T reguladores (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014; ANTONIOLI *et al.*, 2019; LAMMERS *et al.*, 2020). Ainda, a adenosina desempenha uma estimulação das células  $\beta$  pancreáticas, aumentando a secreção de insulina, e uma maior sensibilização dos tecidos periféricos à insulina, o que aumenta a captação tecidual de glicose (NIRAULA *et al.*, 2018; SINGH; GIBERT; DWYER, 2018).

Em decorrência da presença desses níveis de adenosina, em uma situação inflamatória, há deflagração de uma resposta de hidrólise com aumento dos níveis de ADA (PASSOS *et al.*, 2018). Tal aumento dos níveis de ADA em linfócitos foi identificado em nosso estudo, cujos resultados demonstraram que sua atividade estava significativamente maior no GD do que no GC. Esse aumento bem como o descontrole glicêmico identificado em nossa pesquisa representam a promoção de um estado inflamatório, juntamente a uma diminuição da captação da glicose e o desenvolvimento de resistência insulínica, o que pode estar relacionado a uma disfunção dos linfócitos T, os quais sofrem proliferação e liberam citocinas pró-inflamatórias (LEE *et al.*, 2011; NIRAULA *et al.*, 2018; SINGH; GIBERT; DWYER, 2018; CAO *et al.*, 2021).

Lee *et al.* (2011) mostrou aumento significativo da enzima em pacientes com DM2 comparados a pacientes não-diabéticos, além de uma correlação positiva entre a ADA e a glicemia sérica. O mesmo fora evidenciado por Niraula *et al.* (2018), em que os com DM2

descontrolada (HbA1c > 7%) apresentaram níveis séricos de ADA significativamente aumentados quando comparados a pacientes com DM2 controlada (HbA1c < 7%) e destes ao grupo controle não-diabético, e uma correlação positiva entre ADA sérico e HbA1c, glicemia de jejum e glicemia pós-prandial, respectivamente. No estudo de Cao *et al.* (2021) observou-se que o acúmulo de ADA está positivamente correlacionado aos níveis de Hb1Ac e negativamente correlacionado à função da célula beta pancreática.

Dessa forma, é possível identificar que a atividade integrada de NTPDases e ADA, considerando seu papel na degradação dos ede ATP, ADP e adenosina, são particularmente importantes para equilibrar os efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios do ATP liberado para o meio extracelular. Assim, o aumento desses componentes do sistema purinérgico em linfócitos de pacientes com DM2 reforça sua possível relação com o sistema imune no espectro de regulação do estado inflamatório de baixo grau da DM2.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos achados é possível inferir a participação das enzimas NTPDase, ADA e níveis de ATP extracelular na patogênese da DM2. Assim, na via de degradação do ATP extracelular (atuando como marcador inflamatório e de dano), sugere-se a relação entre seu aumento com o aumento da atividade da NTPDase e ADA expressas em linfócitos e a atuação desses componentes na regulação dos mecanismos inflamatórios e de homeostase da insulina do grupo de mulheres diabéticas.

Esses resultados reafirmam a importância do entendimento da relação dos componentes purinérgicos e suas alterações que influenciam diretamente no sistema imunológico de mulheres diabéticas, indicando que podem ser utilizados como possíveis marcadores prognósticos, bem como alvos terapêuticos para que se alcance uma redução na proliferação de células inflamatórias, bem como na liberação de citocinas pró-inflamatórias com o objetivo de promover um estado de maior sensibilidade insulínica.

## REFERÊNCIAS

- ANTONIOLI, L. *et al.* Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. **Immunology Letters**, v. 205, p. 9–15, jan. 2019.
- BLACKBURN, M. R. *et al.* Adenosine Receptors and Inflammation. Em: WILSON, C. N.; MUSTAFA, S. J. (Eds.). **Adenosine Receptors in Health and Disease**. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. v. 193p. 215–269.
- 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, maio 1976.
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 661, 25 set. 2017.
- BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J.-M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 529–564, dez. 2014.
- BURNSTOCK, Geoffrey; NOVAK, Ivana. Purinergic signalling and diabetes. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 3, p. 307–324, 2013.
- CAO, J. *et al.* Inverse relationship between serum adenosine deaminase levels and islet beta cell function in patients with type 2 diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 13, n. 1, p. 54, dez. 2021.
- CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375–380, set. 1986.
- CHATTERJEE, Sudesna; KHUNTI, Kamlesh; DAVIES, Melanie J. Type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239–2251, 2017.
- DE LIMA, André Campos; CHAVES, Lucas Macedo; PRESTES, Samantha Nuncio; *et al.* The purinergic signalling and inflammation in the pathogenesis and progression of diabetes: key factors and therapeutic targets. **Inflammation Research**, 2022.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, Mariana H.; PORTALES-CERVANTES, Liliana; CORTEZ-ESPINOSA, Nancy; *et al.* Expression and function of P2X(7) receptor and CD39/Entpd1 in patients with type 2 diabetes and their association with biochemical parameters. **Cellular Immunology**, v. 269, n. 2, p. 135–143, 2011.
- GARCIA-JACOBO, Rocio Edith; BERGAMIN, Leticia Scussel; VULTAGGIO-POMA, Valentina; *et al.* The Purinergic Landscape of Type 2 Diabetes Mellitus. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 1838, 2022.

- GIUSTI, G.; GALANTI, B. Methods of enzymatic analysis. **Verlag Chemie**, 315-323, 1984.
- GUZMAN-FLORES, Juan M.; CORTEZ-ESPINOSA, Nancy; CORTÉS-GARCIA, Juan D.; *et al.* Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. **Immunobiology**, v. 220, n. 8, p. 976–984, 2015.
- KARAMOHAMED, S.; GUIDOTTI, G. Bioluminometric method for real-time detection of ATPase activity. **BioTechniques**, v. 31, n. 2, p. 420–425, 2001.
- KOBAYASHI, Daichi; SUGIURA, Yuki; UMEMOTO, Eiji; *et al.* Extracellular ATP Limits Homeostatic T Cell Migration Within Lymph Nodes. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.
- LAMMERS, Mônica D.; ANÉLI, Nyasmin M.; DE OLIVEIRA, Gabriela G.; *et al.* The anti-inflammatory effect of resistance training in hypertensive women: the role of purinergic signaling. **Journal of Hypertension**, v. 38, n. 12, p. 2490–2500, 2020.
- LEAL, Daniela B. R.; STREHER, Cristiane A.; NEU, Tiago N.; *et al.* Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1721, n. 1–3, p. 9–15, 2005.
- LEE, J.-G. *et al.* Changes in Adenosine Deaminase Activity in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Effect of DPP-4 Inhibitor Treatment on ADA Activity. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 35, n. 2, p. 149, 2011.
- LONTCHI-YIMAGOU, Eric; SOBNGWI, Eugene; MATSHA, Tandi E.; *et al.* Diabetes Mellitus and Inflammation. **Current Diabetes Reports**, v. 13, n. 3, p. 435–444, 2013.
- LUNKES, Gilberto Inácio *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189–194, fev. 2003.
- MALTA, Deborah Carvalho; DUNCAN, Bruce Bartholow; SCHMIDT, Maria Inês; *et al.* Prevalência de diabetes *mellitus* determinada pela hemoglobina glicada na população adulta brasileira, Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, 2019.
- NIRAULA, A. *et al.* Adenosine deaminase activity in type 2 diabetes mellitus: does it have any role? **BMC Endocrine Disorders**, v. 18, n. 1, p. 58, dez. 2018.
- PASSOS, D. F. *et al.* Adenosine signaling and adenosine deaminase regulation of immune responses: impact on the immunopathogenesis of HIV infection. **Purinergic Signalling**, v. 14, n. 4, p. 309–320, dez. 2018.
- PILLA, Carmen *et al.* ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, n. 4, p. 225–230, jan. 1996.
- QIAN, Yanrong; WANG, Xuan; LI, Yunsheng; *et al.* Extracellular ATP a New Player in Cancer Metabolism: NSCLC Cells Internalize ATP In Vitro and In Vivo Using Multiple Endocytic Mechanisms. **Molecular cancer research: MCR**, v. 14, n. 11, p. 1087–1096, 2016.

SINGH, A.; GIBERT, Y.; DWYER, K. M. The adenosine, adrenergic and opioid pathways in the regulation of insulin secretion, beta cell proliferation and regeneration. **Pancreatology**, v. 18, n. 6, p. 615–623, set. 2018.

STENTZ, F.; KITABCHI, A. Activated T Lymphocytes in Type 2 Diabetes: Implications From in Vitro Studies. **Current Drug Targets**, v. 4, n. 6, p. 493–503, 1 ago. 2003.

SUN, Hong *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes research and clinical practice**, v. 183, p. 109119, 2022.

TRABANELLI, S. *et al.* Extracellular ATP Exerts Opposite Effects on Activated and Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells via Purinergic P2 Receptor Activation. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 3, p. 1303–1310, 1 ago. 2012.

YEGUTKIN, Gennady G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 6, p. 473–497, 2014.