

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

**MARIA LUIZA MUKAI FRANCIOSI
MILLENA DAHER MEDEIROS LIMA**

**A IMPORTÂNCIA DA NTPDASE E DA ADA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES
COM LESÃO INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU DO COLO UTERINO**

CHAPECÓ

2022

**MARIA LUIZA MUKAI FRANCIOSI
MILLENA DAHER MEDEIROS LIMA**

**A IMPORTÂNCIA DA NTPDASE E DA ADA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES
COM LESÃO INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU DO COLO UTERINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de bacharel em medicina.

Orientadora: Prof. Dr^a Andréia Machado Cardoso.

Coorientadoras: Prof. Dr^a Daniela Zanini e Prof. Dr^a Adriana Wagner.

CHAPECÓ

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Franciosi, Maria Luiza Mukai; Lima, Millena Daher Medeiros

A IMPORTÂNCIA DA NTPDASE E DA ADA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM LESÃO INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU DO COLO UTERINO / Maria Luiza Mukai Franciosi; Millena Daher Medeiros Lima. -- 2022.

17 f.:il.

Orientadora: Dr^a Andreia Machado Cardoso

Coorientadores: Dr^a Daniela Zanini, Dr^a Adriana Wagner

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

1. Papilomavírus humano. 2. Sistema purinérgico. 3. Linfócitos. 4. HSIL. I. Cardoso, Andreia Machado, orient. II. Zanini, Daniela, co-orient. III. Wagner, Adriana, co-orient. IV. Universidade Federal da Fronteira Sul. V. Título.

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

**MARIA LUIZA MUKAI FRANCIOSI
MILLENA DAHER MEDEIROS LIMA**

**A IMPORTÂNCIA DA NTPDASE E DA ADA EM LINFÓCITOS 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 **Andréia Machado Cardoso**
Coorientadoras: Professora Dr.^a. **Daniela Zanini** e Professora Dr.^a. **Adriana Wagner**

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

BANCA EXAMINADORA

Daniela Zanini

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

Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Prof.^a Dr.^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel – UFFS
Avaliador 1

Luiz Alberto Barcellos Marinho

Prof.^o Dr.^o Luiz Alberto Barcellos Marinho – UFFS
Avaliador 2

A IMPORTÂNCIA DA NTPDASE E DA ADA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM LESÃO INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU DO COLO UTERINO

Maria Luiza Mukai Franciosi*¹
Millena Daher Medeiros Lima*²
Daniela Zanini*³
Adriana Wagner*⁴
Andreia Machado Cardoso*⁵

RESUMO

A infecção persistente por subtipos oncogênicos do Papilomavírus humano (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL), que são precursoras do câncer de colo uterino. Há associação entre essa infecção e alterações em vias do sistema de sinalização purinérgica. Desse modo, este é o primeiro estudo descrito na literatura que avaliou a atividade de enzimas purinérgicas NTPDase e adenosina deaminase (ADA) em linfócitos de pacientes com HSIL não tratadas e em grupo controle, constituído de mulheres saudáveis. Participaram desse estudo 32 mulheres com diagnóstico citopatológico de HSIL e 35 mulheres do grupo controle. A atividade enzimática da NTPDase, utilizando substrato de ATP e ADP, e da ADA foi avaliada por meio de método colorimétrico. Como resultado, encontrou-se que a hidrólise do ATP e ADP está aumentada pela maior atividade da NTPDase no grupo com HSIL em comparação ao grupo controle. Resultado semelhante foi encontrado para a atividade da ADA e o $p < 0,05$ foi considerado em todas as análises. Com isso, demonstrou-se que as pacientes com HSIL não tratadas apresentam maior atividade da NTPDase e ADA, em linfócitos, quando comparadas a indivíduos saudáveis. Este estudo contribui para a compreensão da fisiopatologia do desenvolvimento do câncer de colo uterino, uma vez que o aumento da hidrólise do ATP em adenosina, por meio das atividades das enzimas descritas, promoveria a redução da concentração de componentes pró-inflamatórios e aumento de substâncias imunossupressoras, levando à progressão tumoral.

Palavras-chave: Papilomavírus humano; sistema purinérgico; linfócitos; lesão intraepitelial de alto grau.

*¹ Acadêmica do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: maria.mukaif@gmail.com

*² Acadêmica do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: mldaher27@gmail.com

*³ Docente do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. E-mail: daniela.zanini@uffs.edu.br

*⁴ Docente do Curso de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: adriana.wagner@uffs.edu.br

*⁵ 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

As lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) no colo do útero são consideradas as precursoras do câncer de colo uterino, que corresponde à quarta neoplasia mais frequente em mulheres no mundo (SENAPATI; SENAPATI; DWIBEDI, 2016). Em números, isso representa mais de 600 mil novos casos e 300 mil mortes ao ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento da neoplasia cervical (SCHIFFMAN et al., 1993; KAUFMAN et al., 1997). Cerca de 80% das mulheres são infectadas por um subtipo do HPV em algum momento da vida e a maioria das infecções são autolimitadas (TROTIER; FRANCO, 2006).

Em alguns casos, no entanto, a persistência da infecção por subtipos oncogênicos de HPV - principalmente os tipos 16 e o 18, pode desencadear a ruptura de mecanismos envolvidos na diferenciação e apoptose. Tal mecanismo predispõe a progressão tumoral e é fator chave para o desenvolvimento da HSIL e, mais tarde, do câncer de colo uterino (BODA et al., 2018; OKUNADE, 2020; KHIEU; BUTLER, 2022). O rastreamento dessas lesões intraepiteliais é feito a partir do exame citopatológico do colo uterino e a vacinação contra o HPV é a principal medida preventiva (DUNNE; PARK, 2013; SSENTONGO et al., 2022).

Já é amplamente discutido na literatura que o desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias é caracterizado por um estado inflamatório crônico e intenso (DI VIRGILIO, 2012). No que se refere à progressão das HSIL ao câncer de colo uterino, sabe-se que, por distintos mecanismos celulares, incluindo inflamação, hipóxia e a apoptose, o microambiente tumoral é abundante em moléculas de nucleotídeos. Um desses componentes é a adenosina trifosfato (ATP), que pode induzir tanto um efeito antitumoral quanto imunossupressor, quando degradada até adenosina, o que sugere o impacto da sinalização purinérgica na modulação do crescimento e morte celular (MELLO et al., 2014).

O sistema purinérgico compreende diversos nucleotídeos de adenina, nucleosídeos, receptores purinérgicos e ectonucleotidases que atuam regulando funções celulares em condições fisiológicas e patológicas (MALDONADO et al., 2012). Por meio da ação da enzima ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) e ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), o ATP extracelular é desfosforilado em adenosina difosfato (ADP) e em adenosina monofosfato (AMP). A ecto-5'-nucleotidase (CD73) degrada o AMP à adenosina, que por fim é convertida em inosina pela adenosina deaminase (ADA) (DI VIRGILIO et al., 2018).

Tanto o ATP quanto a adenosina têm papel crucial na progressão tumoral. Enquanto o ATP, quando ativa os receptores P2 da superfície celular de linfócitos, geralmente apresenta efeito inflamatório contra o crescimento tumoral; a adenosina, quando ativa receptores P1, contribui com o estado imunossupressor, o que pode promover a progressão tumoral por estimular a proliferação celular desordenada, a neovascularização e a falha dos mecanismos que controlam a apoptose (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013; GAO; DONG; ZHANG, 2014; KEPP et al., 2021).

Sendo assim, apesar de ser clara a relação entre o sistema purinérgico e o surgimento de diversos tipos de câncer, até hoje, pouco foi investigado acerca da sua relação com as lesões precursoras do câncer de colo uterino. Desse modo, torna-se necessário melhor compreender os mecanismos imunológicos e inflamatórios que participam do início do desenvolvimento neoplásico. O presente estudo é o primeiro descrito na literatura que avalia a atividade da NTPDase e da ADA, expressas em linfócitos, de pacientes com HSIL não submetidas a tratamento, e em indivíduos controle saudáveis.

2 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo quantitativo, a partir do qual foram avaliadas as atividades de enzimas do sistema purinérgico em linfócitos de pacientes com HSIL e em indivíduos controle saudáveis.

2.1 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES

Os experimentos foram realizados com amostras sanguíneas coletadas de trinta e duas (32) pacientes com diagnóstico citopatológico de HSIL, previamente ao início de tratamentos farmacológicos e/ou cirúrgicos e trinta e cinco (35) indivíduos controle saudáveis. A seleção dessas pacientes foi feita a partir de contato prévio dos pesquisadores com médicos(as) oncologistas e/ou ginecologistas dos serviços de saúde do município de Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

No momento do diagnóstico e anteriormente ao início da terapia, durante a consulta com o especialista, as pacientes foram informadas sobre a pesquisa e convidadas a participar da mesma. Após os pesquisadores informarem os objetivos do estudo e as intervenções a serem realizadas, as participantes foram convidadas a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), consentindo em participar da pesquisa, e foram submetidas à coleta única de trinta mililitros (30 mL) de sangue periférico, por meio de punção venosa. Os indivíduos controle saudáveis foram abordados em outros ambientes do município de Chapecó, como em unidades básicas de saúde, com base no pareamento por idade (+/- 5 anos) em relação às pacientes.

Foram incluídas no estudo pacientes voluntárias entre dezoito (18) e sessenta (60) anos, com resultado de exame citopatológico de HSIL, e que não realizaram tratamento prévio. O grupo controle foi composto de voluntárias na mesma faixa etária, e que não possuíam doença aguda ou crônica no momento da pesquisa. Não foram aplicados critérios de exclusão para mulheres portadoras de doenças crônicas (como diabetes e hipertensão arterial sistêmica). Foram excluídas deste estudo mulheres previamente diagnosticadas com algum tipo de malignidade.

Os materiais biológicos das pacientes e controles foram devidamente encaminhados aos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó, onde foram processados e armazenados. As amostras de linfócitos foram congeladas em freezer a -80°C para posterior análise. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul, no dia 19 de maio de 2019, sob o número de parecer 3.333.426.

2.2 ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS

Leucócitos mononucleares foram isolados de sangue humano coletado com EDTA e separados em gradientes de densidade Ficoll-Hypaque como descrito por Böyum (1968).

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENTPDASE

A atividade da enzima NTPDase em linfócitos foi determinada como previamente descrito por Leal et al. (2005). A atividade foi determinada medindo a quantidade de fosfato inorgânico liberado usando um ensaio colorimétrico. O meio de reação continha 0,5 mM de CaCl₂, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, glicose 60 mM e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 em um volume final de 200 µL. Vinte microlitros de linfócitos suspensos em solução salina foram adicionados ao meio de reação (2-4 µg de proteína) e pré-incubados por 10 min a 37°C. A

reação foi iniciada pela adição do substrato (ATP ou ADP) a uma concentração final de 2 mM e interrompida com 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10% para fornecer uma concentração final de 5%. 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. Controles com adição da preparação enzimática após a adição de TCA foram usados para corrigir a hidrólise não enzimática do substrato. As análises foram executadas em duplicata, e a atividade foi expressa como nmolPi/min/mg proteína.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADA

A atividade da enzima ADA, também em linfócitos, foi determinada de acordo com o protocolo já descrito de Giusti e Galanti (1984). A quantidade de 50 μ L de linfócitos 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 0,7-0,9 mg/mL. Os resultados foram expressos em U/L. Uma unidade (1U) de ADA é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de amônia por minuto de adenosina em condições de ensaio padrão.

2.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) com o uso do corante de “*Coomassie brilliant blue*” BG-250 e albumina de soro bovino como padrão.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados estatisticamente pela realização do teste de Shapiro-Wilk e Teste t não pareado. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$ em todas as análises. O programa (*software*) estatístico utilizado foi o GraphPad® Prism 5.

3 RESULTADOS

3.1 FAIXA ETÁRIA DAS PARTICIPANTES

As idades foram estatisticamente semelhantes no grupo das pacientes com HSIL ($35,03 \pm 11,88$) quando comparadas ao grupo controle ($33,85 \pm 6,40$).

3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE COMPONENTES DO SISTEMA PURINÉRGICO

A avaliação das atividades enzimáticas da NTPDase, para ATP e ADP como substrato, e da ADA foram determinadas a partir da análise de amostras de linfócitos do grupo de pacientes com diagnóstico de HSIL e do grupo controle saudável. Em relação à NTPDase, usando ATP como substrato, observou-se um aumento na sua atividade no grupo de pacientes

com HSIL quando comparado ao grupo controle, respectivamente [$108,9 \pm 9,416$ (n=24) vs. $87,30 \pm 4,708$ (n=32) nmol Pi/min/mg de proteína] ($p < 0,05$) (**Figura 1**). A atividade de NTPDase, usando ADP como substrato de ADP, também está aumentada no grupo de pacientes com HSIL quando comparado ao grupo controle, respectivamente [$70,56 \pm 8,485$ (n=25) vs. $30,93 \pm 2,520$ (n=34) nmol Pi/min/mg de proteína] ($p < 0,05$) (**Figura 2**). Em relação à enzima ADA, observou-se um aumento na sua atividade em linfócitos de pacientes com HSIL em relação aos controles, respectivamente [$35,15 \pm 6,051$ (n=16) vs. $4,691 \pm 0,3456$ (n=35) U/L] ($p < 0,05$) (**Figura 3**).

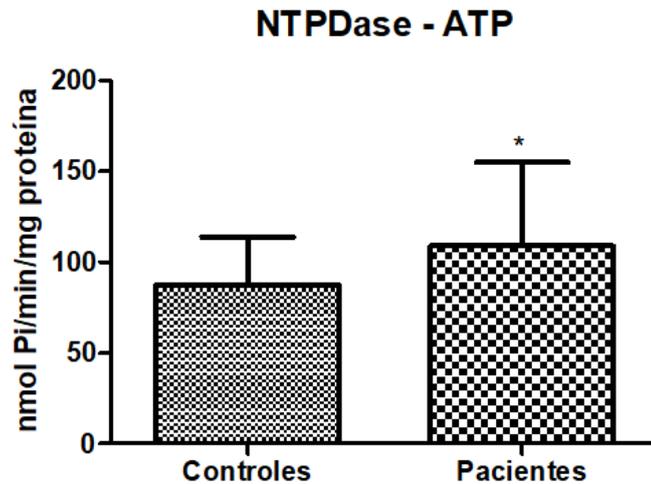


Figura 1 - Atividade da NTPDase utilizando ATP como substrato. *Indica $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

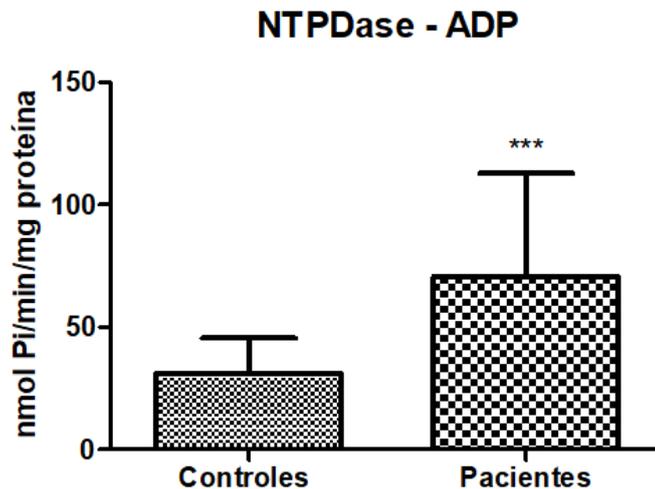


Figura 2 - Atividade da NTPDase utilizando ADP como substrato. *** Indica $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

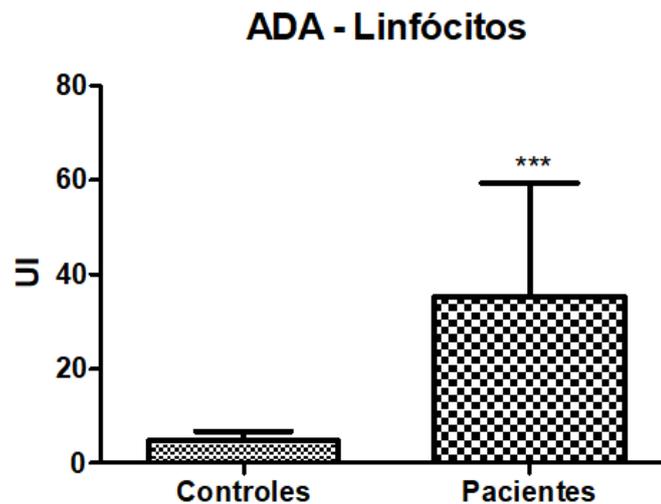


Figura 3 - Atividade da ADA em linfócitos. *** Indica $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

Desse modo, os resultados demonstraram que a atividade de enzimas do sistema purinérgico - NTPDase e ADA em linfócitos - estão aumentadas em grupo pacientes com HSIL quando comparado ao grupo controle.

4 DISCUSSÃO

A elucidação da influência do sistema de sinalização purinérgica é importante para que o mecanismo sobre o desenvolvimento das lesões intraepiteliais do colo uterino seja melhor compreendido. Nosso estudo demonstrou que a atividade da NTPDase, que está expressa na membrana de células amplamente distribuídas no organismo - incluindo linfócitos, estaria aumentada em pacientes com HSIL. Como já citado, a principal função da NTPDase é hidrolisar o ATP extracelular em ADP e AMP, produtos que poderão ser convertidos em adenosina pela CD73. Além disso, a expressão aumentada dessa enzima é estimulada em resposta ao processo inflamatório, como o que ocorre em dano tecidual, hipóxia e estresse oxidativo. Desse modo, estudos foram feitos associando o aumento da atividade da NTPDase ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer (MOESTA; LI; SMYTH, 2020; BAGHBANI et al., 2021). A regulação positiva da NTPDase está relacionada a um pior prognóstico no contexto oncológico (ALLARD et al., 2017).

O ATP, que é convertido nos demais nucleotídeos de adenina pela NTPDase, promove as suas ações pró-inflamatórias por meio da ativação dos receptores purinérgicos P2X7 (ZHOU et al., 2009) e P2Y (BUKHARI et al., 2015), já demonstrados como presentes em linfócitos por meio de experimentos no câncer de colo uterino. Além disso, a NTPDase também tem sido descrita como uma promotora do crescimento e sobrevivência celular, visto que a enzima parece mediar um aumento compensatório na glicólise aeróbia - efeito Warburg - e tem sido proposta como um importante alvo terapêutico no contexto antitumoral (FANG et al., 2010). Além disso, a ativação dos receptores P2X7, P2Y2 e P2Y4 pelo ATP contribui para a promoção de vias mitogênicas, angiogênicas e inflamatórias, pois estimulam a produção e liberação de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, como a IL-6 (FRANCIOSI et al., 2022).

Diante de tais aspectos, os linfócitos são peça fundamental para a ação da sinalização purinérgica no contexto da HSIL. Sabe-se que tanto as lesões intraepiteliais quanto o câncer de colo uterino levam à ativação de cascatas imunológicas e inflamatórias (YUAN et al., 2021). Em revisão sistemática publicada por Litwin et al. (2021), estudou-se a presença dos principais

tipos de linfócitos nestas doenças. Os linfócitos T, que expressam CD4+, e os citotóxicos, que expressam CD8+, estão em maior quantidade nos tecidos cervicais em pacientes com câncer de colo uterino em comparação com o grupo com lesão intraepitelial (LITWIN et al., 2021), reforçando a importância dessas células no processo de desenvolvimento tumoral. Ainda assim, tais análises diante à fisiopatologia são necessárias, uma vez que o ATP está intrinsecamente relacionado à função dos linfócitos e liberação de citocinas.

Resultados semelhantes aos encontrados por nosso grupo foram observados por outros pesquisadores em relação à atividade enzimática da NTPDase, porém em plaquetas. Em relação às plaquetas, a pesquisa de Muñoz-Godínez et al. (2020) analisou grupos de pacientes diagnosticadas com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), HSIL e câncer de colo uterino e grupo controle. Segundo o autor, a atividade da NTPDase aumentou de acordo com a progressão da doença. Por outro lado, estudo de Maldonado et al. (2012) divergiu deste resultado e com os mesmos grupos em análises de plaquetas encontrou que, para a hidrólise de ATP, a atividade de NTPDase estaria diminuída em grupos de pacientes com LSIL, HSIL e câncer de colo uterino quando comparados ao grupo controle. Esta pesquisa também avaliou a atividade da NTPDase para a hidrólise de ADP e o resultado foi que a atividade da enzima estaria aumentada em pacientes com LSIL em comparação com os demais grupos.

Adicionalmente, o estudo de Gutiérrez-Hoya et al. (2019) analisou o anticorpo específico anti-CD39 em linhagens de cultura celular do câncer de colo uterino, incluindo HeLa (HPV 18) e CaSki (HPV 16). Como resultado, foi encontrado que a expressão de CD39 foi maior em células infectadas pelo HPV quando comparadas a células de linhagem não infectada. Mora-García et al. (2016), por sua vez, pesquisou a expressão e atividade de CD39 em outra linhagem celular, CeCa-MSCs, comparada a MSCs normais derivadas de tecido cervical. Neste trabalho, houve um aumento de ambos os parâmetros analisados no grupo que representava o tumor.

Ainda, outro estudo que avaliou a atividade e expressão de CD39 em linhagens celulares foi o de Beckenkamp et al. (2014). Nesta pesquisa, as linhagens avaliadas foram a SiHa (HPV 16), HeLa (HPV 18) e C33A (linhagem não infectada por HPV). A hidrólise extracelular dos nucleotídeos do sistema purinérgico por SiHa e HeLa seguiram a seguinte ordem: ATP > AMP > ADP, porém para C33A não houve diferença na taxa de hidrólise de ATP e ADP. Dentre as linhagens, a SiHa apresentou as maiores taxas de degradação de ATP, de acordo com o nível de mRNA quantificado por PCR em tempo real.

Vale destacar que os estudos acima referem-se a análises em plaquetas e linhagens de células infectadas por subtipos oncogênicos do HPV. As plaquetas têm funções distintas dos linfócitos no contexto da oncogênese, pois agem em receptores distintos, o P2Y12, e têm a ação relacionada à coagulação (KROUPENOVA; RAVID, 2018). Apesar disso, por este ser o primeiro trabalho que avalia as enzimas purinérgicas em amostras de linfócitos, uma breve descrição sobre os resultados que já foram encontrados em pesquisas anteriores mostrou-se necessária.

Diante do exposto, demonstra-se que a relação entre NTPDase e desenvolvimento de lesões intraepiteliais são importantes para a progressão tumoral do câncer de colo uterino. Em nosso estudo, justifica-se o aumento da atividade da NTPDase como uma resposta ao aumento da concentração de ATP no meio extracelular do microambiente da HSIL. Com isso, sendo o ATP uma molécula pró-inflamatória, a imunomodulação caminha no sentido da conversão dessa molécula em um componente imunossupressor, a adenosina. Segundo estudos anteriores, a adenosina também estaria em concentrações elevadas nesse tipo de tumor. Assim, o sistema purinérgico desenvolve um papel fisiopatológico antagônico, pois, ao mesmo tempo que o ATP promove inflamação, aumento do dano tecidual e elevação dos componentes de estresse oxidativo, a degradação desta molécula pela NTPDase contribui para a geração de adenosina, e, conseqüentemente, permite a progressão tumoral (PFAFFENZELLER; FRANCIOSI; CARDOSO, 2020; FRANCIOSI et al., 2022).

Outra enzima essencial no metabolismo das purinas é a ADA, que em conjunto com a adenosina quinase (ADK), realiza importante papel na regulação dos níveis de adenosina, um nucleosídeo com efeito imunossupressor no microambiente tumoral, como já descrito pela literatura (ALLARD et al., 2020). A ADA está presente tanto no meio intracelular como na superfície celular, e atua convertendo a adenosina e a desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente, a partir de uma reação de desaminação irreversível (SPYCHALA, 2000). A adenosina regula as respostas imunes inatas e adaptativas a partir da interação com quatro diferentes receptores acoplados à proteína G (P1), sendo eles: A1, A2A, A2B e A3, que são amplamente expressos na membrana de células imunes da linhagem linfóide e mieloide; e quando ativados, podem repercutir no desempenho imunológico frente ao desenvolvimento tumoral (ANTONIOLI et al., 2012; DI VIRGILIO; VUERICH, 2015).

A ligação de adenosina a receptores A2A, em linfócitos presentes no tumor, desencadeia o aumento da expressão de IL-10 e TGF- β no meio extracelular, levando a condições imunossupressoras e à inibição de uma resposta imune antitumoral ao longo da progressão da HSIL ao câncer de colo uterino (PFAFFENZELLER; FRANCIOSI; CARDOSO, 2020; SEK et al., 2018). Assim, estudos já elucidaram que a atuação da ADA é um ponto chave na regulação das respostas purinérgicas a diferentes condições inflamatórias e alguns tipos de câncer, incluindo o câncer de colo uterino (ZHULAI et al., 2022). No entanto, os mecanismos enzimáticos e os efeitos das alterações na atividade da ADA ainda são controversos na literatura (NAMIOT et al., 1996; CANBOLAT et al., 1996).

Em nosso estudo foi encontrado um aumento na atividade da ADA em linfócitos de pacientes com HSIL, quando comparados ao grupo controle. Desta forma, é possível supor que esse aumento ocorra em virtude da alta concentração de adenosina no microambiente tumoral, que serve como substrato e contribui para o aumento de atividade catalítica. Ainda, é possível que esse fenômeno funcione como um mecanismo compensatório frente ao elevado metabolismo das purinas; de modo que, ao catalisar a quebra da adenosina, diminuindo a sua disponibilidade para ação nos linfócitos, a enzima reverte a capacidade imunossupressora. Em outras palavras, o aumento da atividade da ADA inibe a redução da proliferação, da ativação e da função efetora dos linfócitos T citotóxicos - fenômenos que desencadeariam a proliferação de células tumorais - e, por consequência, estimula a resposta antitumoral (MALDONADO et al., 2012).

Na literatura, até o presente momento, estudos semelhantes foram realizados apenas em plaquetas e no soro, e os resultados encontrados serão comentados aqui. Maldonado et al. (2008) observaram que a atividade da ADA em plaquetas estava significativamente reduzida em pacientes com HSIL tratadas por conização ou radioterapia, quando comparadas ao grupo controle saudável e com o grupo câncer de colo uterino não tratado. Quando analisada no soro, a atividade da ADA estava reduzida nos grupos com HSIL submetidos à conização, em relação aos demais grupos analisados. Este estudo sugere que a atividade enzimática diminui após as intervenções terapêuticas - possivelmente em virtude do menor acúmulo de adenosina. Em outro estudo, Maldonado et al. (2012) observou que a atividade total da ADA em plaquetas estava aumentada no grupo de pacientes com LSIL quando comparadas aos grupos com HSIL, câncer e controle saudáveis. Para os autores, esse aumento pode ser explicado devido à reação imune à infecção inicial pelo HPV. Apesar de tais resultados anteriores, nosso estudo não avaliou pacientes com LSIL.

Diante dos aspectos discutidos, é inegável a importância das vias de sinalização do sistema purinérgico na história natural da doença - o câncer de colo uterino - a partir da infecção pelo HPV. A partir deste estudo, tendo em vista os resultados obtidos, espera-se que novas pesquisas sejam realizadas tanto para a compreensão da fisiopatologia, quanto para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos farmacológicos para esse tipo de doença. Este artigo contribui na elucidação do papel antagônico do ATP, uma vez que esta molécula

desencadeia funções celulares relacionadas à inflamação e, por meio dela, há a liberação da adenosina, um componente imunossupressor. Por fim, cabe mencionar o artigo de Savio et al. (2018) que traduziu este papel antagônico do ATP em uma pergunta: “*an angel or a demon?*”. Vale a reflexão.

5. CONCLUSÃO

Pela primeira vez, foi demonstrado que pacientes com HSIL não tratadas apresentam maior atividade da NTPDase, tanto para a hidrólise de ATP como de ADP, e da ADA, em linfócitos, quando comparados a indivíduos saudáveis. Com isso, este estudo contribui para a compreensão da fisiopatologia do câncer de colo uterino a partir de alterações na via de sinalização purinérgica.

REFERÊNCIAS

- ALLARD, B. et al. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. **Immunological Reviews**, v. 276, n. 1, p. 121-144, mar. 2017.
- ALLARD, B. et al. The adenosine pathway in immuno-oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 10, p. 611-629, out. 2020.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842-862, jun. 2012.
- BAGHBANI, E. et al. Regulation of immune responses through CD39 and CD73 in cancer: Novel checkpoints. **Life Sciences**, v. 282, p. 119826, out. 2021.
- BECKENKAMP, A. et al. Ectonucleotidase expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 92, n. 2, p. 95-104, abr. 2014.
- BODA, D. et al. Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). **International Journal of Oncology**, 29 jan. 2018.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v. 97, p. 77-89, 1968.
- 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.
- BUKHARI, M. et al. Selective permeabilization of cervical cancer cells to an ionic DNA-binding cytotoxin by activation of P2Y receptors. **FEBS Letters**, v. 589, n. 13, p. 1498-1504, 4 jun. 2015.
- BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 4, p. 491-540, dez. 2013.
- CANBOLAT, O. et al. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 37, n. 2, p. 189-193, jun. 1996.
- CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375-380, set. 1986.
- DI VIRGILIO, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 1 nov. 2012.
- DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience**, v. 191, p. 117-123, set. 2015.

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.

DUNNE, E. F.; PARK, I. U. HPV and HPV-Associated Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 765-778, dez. 2013.

FANG, M. et al. The ER UDPase ENTPD5 Promotes Protein N-Glycosylation, the Warburg Effect, and Proliferation in the PTEN Pathway. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 711-724, nov. 2010.

FRANCIOSI, M. L. M. et al. Inflammatory profile in cervical cancer: influence of purinergic signaling and possible therapeutic targets. **Inflammation Research**, v. 71, n. 5–6, p. 555-564, jun. 2022.

GAO, Z.; DONG, K.; ZHANG, H. The Roles of CD73 in Cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, jul. 2014.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Methods of enzymatic analysis. **Verlag Chemie**, 315-323, 1984.

GUTIÉRREZ-HOYA, A. et al. Cervical Cancer Cells Express Markers Associated with Immunosurveillance. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1-10, 6 maio 2019.

KAUFMAN, R. H. et al. Relevance of human papillomavirus screening in management of cervical intraepithelial neoplasia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 176, n. 1 Pt 1, p. 87-92, jan. 1997.

KEPP, O. et al. ATP and cancer immunosurveillance. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 13, jul. 2021.

KHIEU, M.; BUTLER, S. L. High Grade Squamous Intraepithelial Lesion. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, jan. 2022.

KOUPENOVA, M.; RAVID, K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 37, 30 jan. 2018.

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1721, n. 1–3, p. 9-15, jan. 2005.

LITWIN, T. R. et al. Infiltrating T-cell markers in cervical carcinogenesis: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 124, n. 4, p. 831-841, 16 fev. 2021.

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, p. 400-406, abr. 2008.

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.

- 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.
- MOESTA, A. K.; LI, X.-Y.; SMYTH, M. J. Targeting CD39 in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 12, p. 739-755, dez. 2020.
- MORA-GARCÍA, M. D. L. 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, p. 1-13, 7 maio 2019.
- 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. 1-14, 7 dez. 2020.
- NAMIOT, Z. et al. Adenosine deaminase activity in patients with the intestinal type of gastric carcinoma. **Cancer Letters**, v. 109, n. 1-2, p. 199-202, dez. 1996.
- OKUNADE, K. S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 40, n. 5, p. 602-608, 3 jul. 2020.
- PFAFFENZELLER, M. S.; FRANCIOSI, M. L. M.; CARDOSO, A. M. Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical Cancer. **Purinergic Signalling**, v. 16, n. 1, p. 123-135, mar. 2020.
- SAVIO, L. E. B. et al. The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 52, 6 fev. 2018.
- SCHIFFMAN, M. H. et al. Epidemiologic Evidence Showing That Human Papillomavirus Infection Causes Most Cervical Intraepithelial Neoplasia. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 12, p. 958-964, 16 jun. 1993.
- SEK, K. et al. Targeting Adenosine Receptor Signaling in Cancer Immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3837, 2 dez. 2018.
- SENAPATI, R.; SENAPATI, N. N.; DWIBEDI, B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, n. 1, p. 59, dez. 2016.
- SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 2-3, p. 161-173, set. 2000.
- SSENTONGO, P. et al. Association of human papillomavirus vaccination with cervical cancer screening: A systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 101, n. 28, p. e29329, 15 jul. 2022.
- TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, v. 24, p. S4-S15, mar. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. Cancer facts sheets: cervix uteri [Internet]. Lyon: IARC; 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf>

YUAN, Y. et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. **Cancer Letters**, v. 497, p. 243-254, jan. 2021.

ZHOU, L. et al. Regulation of P2X7 gene transcription. **Purinergic Signalling**, v. 5, n. 3, p. 409-426, set. 2009.

ZHULAI, G. et al. Adenosine-Metabolizing Enzymes, Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase, in Cancer. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, p. 418, 8 mar. 2022.