

EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL

EMANOELY ANZILIERO LOPES^{1,2*}, LUCAS NERI BRAZ³, JACIRA BATISTA DE OLIVEIRA⁴, SARAH FRANCO DE OLIVEIRA MACIEL⁵, DANIELA ZANINI^{2,6}

1 Introdução

O Sistema Purinérgico (SP) tem ganhado destaque na compreensão da fisiopatologia de diversas doenças, especialmente devido à sua relação intrínseca com a regulação do sistema imunológico e, conseqüentemente, com a atividade pró-inflamatória, presente tanto no estabelecimento quanto na progressão dessas patologias (Di Virgilio, 2012; Sluyter, 2023; Kiaie et al., 2024). Resumidamente, o SP é composto por um complexo conjunto de enzimas e substratos, como o trifosfato de adenosina (ATP), o difosfato de adenosina (ADP) e o monofosfato de adenosina (AMP), que, ao serem hidrolisados, modulam o sistema imunológico por meio de receptores de membrana, como o P2X7, facilitando a progressão de doenças, como o câncer (Abbraccio; Burnstock, 1994; Sluyter, 2023).

O câncer colorretal (CCR) é uma das várias doenças influenciadas pelo SP em sua progressão. Caracterizado por sua complexidade, o CCR envolve o crescimento anormal de células no cólon e no reto, em escala global, ocupa a terceira posição entre os tumores mais diagnosticados em homens e a segunda entre mulheres (Abar et al., 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) Mais de 1,9 milhão de novos casos de câncer colorretal foram diagnosticados em 2022, e mais de 900 mil mortes foram atribuídas ao CCR (World Health Organization, 2023).

No cenário brasileiro, essa neoplasia é a terceira mais incidente (Brasil, 2019). Diante de sua complexidade e prevalência, torna-se necessário compreender a íntima e complexa

1 Graduação em Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Chapecó*, contato: emanoely.lopes@estudante.uffs.edu.br.

2 Grupo de Pesquisa: Grupo de Pesquisa e Oncologia, Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2022-0436.

3 Graduação em Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Chapecó*, contato: lucasneribraz1@gmail.com

⁴Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Brasil

⁵Professora Doutora em Medicina e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Brasil.

⁶Professora Doutora em Medicina e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Brasil. **Orientadora.**

relação entre os marcadores inflamatórios do SP e o desenvolvimento e progressão do CCR, a fim de que novas estratégias preventivas e terapêuticas possam ser desenvolvidas.

2 Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da enzima E-NTPDase (CD39) na hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) em difosfato de adenosina (ADP) em amostras de plaquetas, além de analisar a expressão do receptor P2X7 em amostras de linfócitos de pacientes diagnosticados com câncer colorretal.

3 Metodologia

O presente trabalho é um estudo transversal, que envolveu um total de 60 participantes, divididos em grupo controle (n=30) e grupo de pacientes (n=30). O grupo de pacientes era composto por indivíduos com diagnóstico prévio CCR, enquanto o grupo controle por indivíduos saudáveis. A abordagem e seleção dos participantes seguiram critérios de inclusão e exclusão previamente definidos.

Foram incluídos, pacientes voluntários entre 30 e 70 anos com diagnóstico CCR esporádico do subtipo adenocarcinoma, sem história familiar da doença, que não passaram por nenhum tratamento prévio. Voluntários entre 30 e 70 anos sem diagnóstico e qualquer doença crônica ou histórico de CCR. Como critério de exclusão, foram descartados os indivíduos que não encaixavam-se nos critérios acima, ou voluntários que utilizavam qualquer medicação de uso contínuo e/ou que apresentem história familiar da doença.

Para garantir a homogeneidade das amostras, os indivíduos do grupo de pacientes foram selecionados antes de qualquer tratamento, seja farmacológico ou cirúrgico. Essa seleção ocorreu por meio de uma colaboração entre os pesquisadores e um médico-cirurgião oncológico, responsável pela avaliação desses pacientes no Hospital Regional do Oeste (HRO). Todos os participantes foram devidamente informados e concordaram com os procedimentos a serem realizados, bem como com o objetivo da pesquisa, assinando voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram coletadas amostras de 30 mL de sangue por meio de punção venosa, utilizando tubos vacutainer padrão. Posteriormente, as análises bioquímicas foram realizadas nos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). A avaliação da atividade enzimática do Sistema Purinérgico foi conduzida em amostras de plaquetas, sendo que a atividade da CD39 foi determinada conforme descrito por Pilla et al. (1996), com modificações de Lunkes et al. (2003). A avaliação da expressão gênica do receptor P2X7 foi

realizada em amostras de linfócitos, seguindo o protocolo experimental de Quantificação Relativa pelo método DDCt.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8. Para o teste de normalidade, as amostras foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk. Aquelas que apresentaram distribuição normal foram analisadas pelo Teste t de Student, enquanto as amostras com distribuição não paramétrica foram analisadas pelo Teste de Mann-Whitney. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$. Todos os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFFS, sob protocolo número: 87508918.4.0000.5564.

4 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram uma relação significativa entre o Sistema Purinérgico (SP) e a resposta pró-inflamatória em indivíduos com câncer colorretal (CCR). Isso se deve ao fato de que tanto a atividade da CD39 quanto a expressão do receptor P2X7 encontram-se elevadas nos pacientes, em comparação com os indivíduos controle. No que se refere à atividade da CD39 na hidrólise do ATP, os indivíduos com CCR apresentaram uma atividade enzimática aumentada em relação aos indivíduos saudáveis [$35,86 \pm 4,62$ vs. $78,90 \pm 9,60$ nmol Pi/min/mg de proteína, em controles e pacientes, respectivamente], com $p \leq 0,0005$.

Esse resultado sugere um possível aumento da disponibilidade de ATP no meio extracelular. O ATP é uma molécula presente em abundância no meio intracelular, cuja principal função é atuar como fonte de energia para a célula (Di Virgilio, 2007; Battastini; Schetinger, 2021; Sluyter, 2023). Em situações de dano tecidual, as células sofrem lise e liberam seu conteúdo no meio extracelular. Portanto, o aumento do ATP disponível nesse meio indica um incremento no dano tecidual causado pela neoplasia (Di Virgilio, 2012; Di Virgilio et al., 2018; Sluyter, 2023). Com mais ATP disponível, observa-se uma maior atividade da enzima CD39, uma vez que o ATP é seu principal substrato. Assim, a CD39 hidrolisa o ATP disponível, removendo uma de suas moléculas de fosfato e produzindo um excedente de ADP (Di Virgilio, 2007; Battastini; Schetinger, 2021; Sluyter, 2023).

O ADP, por sua vez, é extremamente relevante na modulação das células do sistema imunológico, estando fortemente associado ao processo pró-inflamatório (Abbraccio; Burnstock, 1994; Oliveira-Giacomelli et al., 2021; Sluyter, 2023). O principal mecanismo pró-inflamatório do ADP é a ativação das células imunes, por meio de sua ligação a

receptores de membrana da família P2, com destaque para os receptores P2X7, P2Y2 e P2Y6 (Abbracchio; Burnstock, 1994; Oliveira-Giacomelli et al., 2021). Em nossos resultados, observamos um aumento importante na expressão do gene do receptor P2X7 em pacientes com CCR quando comparados ao grupo controle [$1,35 \pm 0,9$ vs. $2,35 \pm 1,22$, em controles e pacientes, respectivamente], com $p < 0,05$. Isso representa um aumento de 1,7 vezes na expressão desse receptor entre os pacientes com câncer colorretal (CCR).

Esse dado torna-se extremamente relevante quando consideramos a associação entre o ADP e o receptor P2X7. Como citado anteriormente, ao se ligar ao P2X7, o ADP estimula uma cascata de sinalização que leva à ativação de células imunológicas, como macrófagos, células dendríticas e certos tipos de células T. Isso resulta na formação de poros de membrana, ativação do inflamassoma e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18 (Abbracchio; Burnstock, 1994; Oliveira-Giacomelli et al., 2021; Sluyter, 2023). Essas moléculas contribuem para a manutenção do estado inflamatório no microambiente tumoral, dificultando a ação imunológica na destruição do tumor e facilitando a progressão da neoplasia (Abbracchio; Burnstock, 1994; Di Virgilio et al., 2018; Oliveira-Giacomelli et al., 2021; Sluyter, 2023).

5 Conclusão

Os resultados deste estudo confirmam a relevância do Sistema Purinérgico (SP) na modulação da resposta inflamatória em pacientes com câncer colorretal (CCR). A elevação significativa da atividade da enzima E-NTPDase (CD39) na hidrólise do ATP, observada em amostras de plaquetas dos pacientes com CCR, sugere um aumento da disponibilidade de ATP no meio extracelular, diretamente associado ao aumento do dano tecidual causado pela neoplasia. Além disso, o aumento da expressão do receptor P2X7 em linfócitos desses pacientes reforça a relação entre o SP e a ativação de células imunológicas pró-inflamatórias, como macrófagos e células T, contribuindo para a manutenção de um microambiente tumoral inflamatório.

Esses achados indicam que a hiperatividade do SP, tanto pela maior disponibilidade de ATP quanto pela ativação do receptor P2X7, desempenha um papel fundamental na progressão do CCR, ao criar um ambiente favorável à inflamação crônica e à resistência da resposta imunológica contra o tumor. Assim, a modulação do SP pode representar uma estratégia terapêutica promissora para o controle da inflamação no microambiente tumoral e para a inibição da progressão do câncer colorretal.

Referências Bibliográficas

- ABAR, L. et al. Height and body fatness and colorectal cancer risk: an update of the WCRF-AICR systematic review of published prospective studies. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 1701–1720, ago. 2018.
- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, n. 3, p. 445–475, 1994.
- BATTASTINI, A. M.; SCHETINGER, M. R. C. O sistema purinérgico e a história das purinas. Em: CARDOSO, A. M.; MANFREDI, L. H.; MACIEL, S. F. V. D. O. (Eds.). **Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas**. [s.l.] Editora UFFS, 2021. p. 28–51.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de Câncer- Câncer de Intestino. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2019.
- CARDOSO, A. M. et al. Sinalização purinérgica e suas implicações fisiológicas. Em: CARDOSO, A. M.; MANFREDI, L. H.; MACIEL, S. F. V. D. O. (Eds.). **Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas**. [s.l.] Editora UFFS, 2021. p. 15–27.
- DI VIRGILIO, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441–5447, 1 nov. 2012.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 1–2, p. 1–3, mar. 2007.
- 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.
- KIAIE, S. H. et al. Pharmacological interaction and immune response of purinergic receptors in therapeutic modulation. **Purinergic Signalling**, v. 20, n. 4, p. 321–343, 1 ago. 2024.
- OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á. et al. Role of P2X7 Receptors in Immune Responses During Neurodegeneration. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 662935, 2021.
- SLUYTER, R. Purinergic Signalling in Physiology and Pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9196, jan. 2023.
- WHO, W. H. O. **Colorectal cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>>. Acesso em: 15 ago. 2024.
- Palavras-chave:** sistema purinérgico, câncer colorretal, inflamação, expressão gênica.
- Nº de Registro no sistema Prisma:** PES 2023- 0562
- Financiamento:** Universidade Federal da Fronteira Sul, edital: Nº 517/GR/UFFS/2023