

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE BEXIGA NÃO INVASIVO

NÁDIA CRISTINA PALOSCHI<sup>1</sup>, LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, SARAH FRANCO  
DE OLIVEIRA MACIEL<sup>3</sup>, MARCELO ZENI<sup>4</sup>, DANIELA ZANINI<sup>5</sup>

O Câncer de Bexiga (CaB) é uma doença desafiadora para a saúde pública, sendo a segunda neoplasia mais comum do sistema geniturinário. Em 2022, causou 220 mil mortes, especialmente entre homens, onde é o sexto câncer mais prevalente (Globocan, 2022).

A investigação dos mecanismos celulares que contribuem para o desenvolvimento do CaB é de grande interesse médico. A literatura científica indica que células tumorigênicas têm alterações significativas em vias de sinalização que regulam crescimento, proliferação e apoptose celular, favorecendo a invasividade de células malignas e o desenvolvimento de metástases (Vaghari-Tabari et al., 2021). Nesse contexto, a sinalização purinérgica ganha destaque porque muitos estudos têm mostrado uma relação estreita entre neoplasias, desenvolvimento e progressão do câncer, e os níveis de nucleotídeos de adenina e adenosina (Ado) séricos e no microambiente tumoral (Kepp et al., 2021; Yegutkin; Boison, 2022).

### 2 Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade das enzimas purinérgicas E-NTPDase e Adenosina Desaminase (ADA) em linfócitos, além de dosar os níveis de interleucinas plasmáticas em pacientes com CaB em diferentes estágios da doença, comparando-os com o grupo controle.

1 Graduação em Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, contato: [nadiapaloschi@hotmail.com](mailto:nadiapaloschi@hotmail.com)

2 Graduação em Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, contato: [albertoufsj@hotmail.com](mailto:albertoufsj@hotmail.com)

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

4 Professor Mestre em Cirurgia do curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Brasil.

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

### 3 Metodologia

Este estudo quantitativo transversal fez parte do Projeto “Guarda-Chuva” intitulado: “Biorrepositório de biópsias tumorais para avaliação da expressão gênica e proteica dos receptores e enzimas do sistema purinérgico em ênfase em tumores de mama, próstata e colorretal”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) (protocolo número 87508918.4.0000.5564).

Participaram da pesquisa 65 indivíduos: 29 pacientes com CaB em estágios iniciais, recentemente diagnosticados e antes de qualquer tratamento, e 36 pessoas de idade semelhante formando o grupo controle. A seleção foi por conveniência, com critérios de inclusão e exclusão bem definidos. Os pesquisadores recrutaram os pacientes através do serviço de Urologia e Quimioterapia do Hospital Regional do Oeste (HRO), em Chapecó/SC, onde foram informados sobre o estudo e convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O sangue venoso coletado foi usado para isolar linfócitos e separar o plasma. As análises bioquímicas e moleculares foram feitas nos laboratórios da UFFS. Informações dos prontuários médicos do HRO complementaram as análises biológicas. A atividade enzimática do sistema purinérgico foi avaliada nas amostras de linfócitos e os biomarcadores inflamatórios no plasma. A atividade das enzimas E-NTPDase seguiu o protocolo de Leal *et al.* (2005) e a da ADA seguiu o protocolo de Giusti e Galanti (1984). Parâmetros inflamatórios foram determinados com o kit CBA (*Cytometric Bead Array*).

A análise estatística foi realizada com o software *GraphPad Prism* 8.0.1, usando o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. As variáveis foram submetidas ao teste t de *Student* e ao teste de *Mann-Whitney*, e as diferenças entre subgrupos foram avaliadas por análise de variância de um fator (ANOVA One-way). Resultados com  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

### 4 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos revelaram diferenças significativas na atividade da enzima E-NTPDase, responsável pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) e da adenosina difosfato (ADP), entre pacientes com CaB e o grupo controle. A atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ATP foi consideravelmente maior no grupo de pacientes com CaB no

Estadiamento I do que no grupo controle [ $143.6 \pm 32.26$  vs.  $87.30 \pm 4.708$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,005$ ). Em relação aos pacientes no Estadiamento 0 do CaB, não houve diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo controle [ $65.78 \pm 13.10$  vs.  $87.30 \pm 4.708$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0 e no grupo controle, respectivamente] ( $p > 0,05$ ). Em relação à hidrólise do ADP, observou-se aumento significativo em pacientes com CaB em Estadiamento 0 e em pacientes com CaB em Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle [ $94.75 \pm 18.55$  vs.  $30.93 \pm 2.520$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0 e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ); [ $143.1 \pm 38.42$  vs.  $30.93 \pm 2.520$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ).

Os nucleotídeos são amplamente reconhecidos na literatura como sinalizadores endógenos de lesões. Em estágios iniciais de doenças tumorais, como os Estadiamentos 0 e I do CaB, que preservam a camada muscular da bexiga, o ATP é a principal molécula sinalizadora de dano celular (Morello et al., 2021). Durante o desenvolvimento e progressão do CaB, grandes quantidades de ATP são liberadas no meio extracelular, criando um microambiente tumoral pró-inflamatório. Este ambiente é intensificado à medida que a progressão tumoral avança, pois a atividade da E-NTPDase aumenta significativamente em pacientes no Estadiamento I do CaB em comparação com aqueles no Estadiamento 0. A maior disponibilidade de ATP extracelular favorece a máxima atividade da E-NTPDase, devido à presença de altas concentrações de substrato.

A atividade da E-NTPDase na hidrólise do ADP, um sinalizador endógeno que induz a agregação plaquetária, foi evidenciada neste estudo. No entanto, os participantes não parecem estar sob risco trombótico, já que o ADP está sendo amplamente hidrolisado a adenosina monofosfato (AMP). Corroborando com esses resultados, altas concentrações de ADP são encontradas em estágios tumorais avançados, estimulando a formação de trombos (Morello et al., 2021).

Com base nesses resultados, pode-se inferir que há geração significativa de Ado nos pacientes com CaB estudados, com Ado sendo regulada pela atividade da ADA. Observou-se um aumento na atividade da ADA tanto em pacientes com CaB em Estadiamento 0, quanto em pacientes com CaB em Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle [ $60.86 \pm$

13.22 vs.  $4.691 \pm 0.3456$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0 e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ); [ $70.45 \pm 17.35$  vs.  $4.691 \pm 0.3456$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ).

Este estudo demonstrou que a atividade da ADA está aumentada no CaB, controlando os altos níveis de Ado gerados pela atuação das enzimas. Esse mecanismo pode controlar a progressão tumoral e evitar a invasão de tecidos adjacentes, melhorando o prognóstico. O acúmulo de Ado, devido ao esgotamento da atividade de ADA em tumores mais avançados, pode resultar em linfotoxicidade e promover imunodeficiência combinada grave (Zanini et al., 2019).

Associado a este estudo, observou-se um aumento significativo dos níveis de IL-4, IL-6 e IL-10 nos pacientes com CaB em relação ao grupo controle. A) IL-4: [ $6.979 \pm 0.7140$  pg/mL vs.  $5.470 \pm 0.3350$  pg/mL, em pacientes e no grupo controle, respectivamente]. B) IL-6: [ $14.85 \pm 2.611$  vs.  $3.350 \pm 0.3011$  pg/mL, em pacientes e no grupo controle, respectivamente]. C) IL-10: [ $3.364 \pm 0.2321$  vs.  $2.564 \pm 0.1750$  pg/mL, em pacientes e no grupo controle, respectivamente]. Corroborando com as investigações, pesquisas mostram que o aumento dos níveis de IL-4 está associado ao processo tumorigênico e à formação de metástase (Venmar et al., 2015). Em estado homeostático normal, os níveis de IL-6 são muito baixos, já em grandes quantidades pode amplificar a inflamação crônica pró-carcinogênica (Whitley et al., 2018). Outrossim, a secreção de IL-10 pelas próprias células tumorais indica uma relação causal entre IL-10 e crescimento tumoral (Mark et al., 2015).

## 5 Conclusão

Pela primeira vez, relacionou-se a atividade da E-NTPDase e da ADA com diferentes estadiamentos tumorais no CaB. A maior disponibilidade de substrato da E-NTPDase promove o aumento da atividade dessa enzima. A maior atividade da ADA consome Ado, protegendo o organismo das ações imunossupressoras dessa molécula. Isso pode ser justificado pelo perfil dos pacientes incluídos no estudo. Experimentos adicionais sobre a expressão de receptores e análises no tecido tumoral são necessários para confirmar esses resultados e possibilitar a integração da modulação da sinalização purinérgica em novos fármacos e protocolos terapêuticos para o controle do CaB.

## Referências Bibliográficas

BRAY, Freddie; LAVERSANNE, Mathieu; SUNG, Hyuna; *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.

MARK, Mannino; ZIWEN, Zhu; HUAPING, Xiao; QIAN, Bai; MARK, Wakefield; YUJIANG, Fang. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer, **Cancer Letters**, v. 367, p. 103-107, 2015. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.009.

MORELLO, S.; CAIAZZO, E.; TURIELLO, R.; CICALA, C. Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39. **Cells**. 2021. DOI:10.3390/cells10092223.

KEPP, Oliver; BEZU, Lucillia; YAMAZAKI, Takahiro; *et al.* ATP and cancer immunosurveillance. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 13, 2021. DOI: 10.15252/embj.2021108130.

VAGHARI-TABARI, M.; FERNS, G.; QUJED, D.; ANDEVARI, A.; SABAHI, Z.; MOEIN, S. Signaling, metabolism and cancer: an important relationship for therapeutic intervention. **Journal of Cellular Physiology**, 2021. DOI: 10.1002/jcp.30276.

VENMAR, K.; KIMMEL, D.; CLIFFEL, D.; FINGLETON, B. IL4 receptor  $\alpha$  mediates enhanced glucose and glutamine metabolism to support breast cancer growth. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2015. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.02.020.

WHITLEY, Sarah K.; BALASUBRAMANI, Anand; ZINDL, Carlene L.; *et al.* IL-1R signaling promotes STAT3 and NF- $\kappa$ B factor recruitment to distal cis-regulatory elements that regulate Il17a/f transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 41, p. 15790–15800, 2018. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002721.

YEGUTKIN, Gennady G.; BOISON, Detlev. ATP and Adenosine Metabolism in Cancer: Exploitation for Therapeutic Gain. **Pharmacological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 799–824, 2022. DOI: 10.1124/pharmrev.121.000528.

ZANINI, Daniela; MANFREDI, Leandro Henrique; PELINSON, Luana Paula *et al.* A atividade da ADA está diminuída em linfócitos de pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado. **Medical Oncology**, v. 36, n. 78, 2019. DOI:10.1007/s12032-019-1301-1.

**Palavras-chave:** Câncer de Bexiga; Sinalização Purinérgica; Linfócitos; Ectonucleotidases; Inflamação.

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES-2023-0551

**Financiamento:** Universidade Federal da Fronteira Sul, EDITAL Nº 566/GR/UFFS/2023