

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA

Vanessa Battisti¹
Liési Konzen Maders²
Paula Acosta Maldonado¹
Maria Rosa Schetinger¹
Vera Maria Morsch¹

Resumo

O câncer de próstata representa um sério problema de saúde pública no Brasil, em virtude de suas altas taxas de incidência e mortalidade. O câncer de próstata atinge principalmente homens acima de 50 anos de idade, sabendo-se, no entanto, que a etiologia do carcinoma prostático permanece desconhecida. No câncer ocorrem alterações bioquímicas e enzimáticas marcantes e a adenosina e os nucleotídeos da adenina possuem papel importante na fisiologia desta doença. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos determinar a atividade das enzimas NTPDase e 5'nucleotidase em plaquetas de pacientes com câncer de próstata divididos em grupos com base na escala de Gleason. Este estudo foi realizado em 62 pacientes e 45 indivíduos controles. Nossos resultados indicaram um aumento na atividade de ambas as enzimas estudadas, principalmente no grupo de pacientes classificados na escala de Gleason > 7, ou seja, com doença mais agressiva. Estes resultados sugerem um aumento na degradação de nucleotídeos, formando uma maior quantidade de ADP que pode estar envolvido em processos inflamatórios e desempenhando funções na agregação de plaquetas. Além disso, o aumento na atividade da enzima 5'-nucleotidase pode estar contribuindo para o aumento na produção de adenosina, que tem importantes funções que favorecem o desenvolvimento das células tumorais, como a neovascularização e a citoproteção.

Palavras-chave: Câncer de próstata. NTPDase. 5' – nucleotidase.

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); v.battisti@bol.com.br

² Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde/UFSM.

Nas últimas décadas o câncer de próstata tem se mostrado um problema relevante de saúde pública no Brasil e no mundo (Calvete et al., 2003). O número de casos de câncer de próstata estimados para o Brasil, no ano de 2008, é de 49.530. Esse valor corresponde a um risco estimado de 52 casos novos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais frequente em todas as regiões do Brasil, com risco estimado de 69/100.000 na região Sul (Instituto Nacional de Câncer, 2008). O sistema de Gleason ajuda a prever a evolução e prever o estágio patológico desta doença (Gleason, 1992). Lesões com escore de Gleason 2-4 (bem diferenciados) têm um comportamento mais ameno e as de escore 7-10 (indiferenciados) são agressivos, respondendo mal às diferentes opções de tratamento. O tratamento deve ser individualizado para cada paciente, levando-se em conta a idade, o estadiamento do tumor, o grau histológico, o tamanho da próstata, as comorbidades, a expectativa de vida, os anseios do paciente e os recursos técnicos disponíveis.

Vários trabalhos evidenciam a estreita relação existente entre os nucleotídeos da adenina e o câncer (Maldonado et al., 2008; Araújo et al., 2005). O controle dos níveis de nucleotídeos na circulação é importante na manutenção do processo de sinalização celular mediado pelos mesmos e também na regulação da agregação plaquetária. Este controle é feito por uma família de enzimas que hidrolisa os nucleotídeos e, conseqüentemente, gera os seus respectivos metabólitos (Borowiec et al., 2006). Estas ecto-enzimas incluem as difosfohidrolases (Ecto-NTPDase), a família das ectonucleotídeos pirofosfato/fosfodiesterases (E-NPP), bem como a 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase (ADA).

A NTPDase (EC 3.6.1.5, CD39) é uma enzima glicosilada ligada à membrana que hidrolisa ATP e ADP em AMP que é subsequentemente convertido à adenosina pela enzima 5' nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73). Ambas as enzimas desempenham um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo pela regulação do catabolismo do ADP (Marcus et al., 2003). A associação clínica entre o tromboembolismo venoso e o câncer é bem conhecida (Donati;

Falanga, 2001), além disso, pacientes com câncer podem exibir aumento da ativação plaquetária (Araújo et al., 2005).

Levando em consideração a possível relação das enzimas que realizam a hidrólise de nucleotídeos com o câncer de próstata e a alta frequência desta doença, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade das enzimas NTPDase e 5' nucleotidase em plaquetas de pacientes com diagnóstico comprovado de câncer de próstata divididos em grupos com base na escala de Gleason.

Metodologia

1. População e Amostragem: A amostragem foi composta por pacientes adultos do sexo masculino provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), no período compreendido entre julho de 2009 e março de 2010, com permissão consentida. Os grupos foram assim distribuídos:

- a) Grupo controle (CT):* Foi composto por voluntários saudáveis, do sexo masculino e idade igual ou semelhante aos demais grupos, que não possuíam nenhum tipo de patologia e que apresentaram valores de PSA dentro dos limites da normalidade (< que 6,5 ng/mL) (n=45).
- b) Grupo de pacientes com câncer de próstata Gleason < 7:* Composto por pacientes diagnosticados com câncer de próstata e classificados pelo patologista, por meio de fragmentos de biópsia, na escala de Gleason < 7 (n = 24).
- c) Grupo de pacientes com câncer de próstata Gleason = 7:* Composto por pacientes diagnosticados com câncer de próstata e classificados pelo patologista, por meio de fragmentos de biópsia, na escala de Gleason = 7 (n = 24).
- d) Grupo de pacientes com câncer de próstata Gleason > 7:* Composto por pacientes diagnosticados com câncer de próstata e classificados pelo patologista, por meio de fragmentos de biópsia, na escala de Gleason > 7 (n = 14).

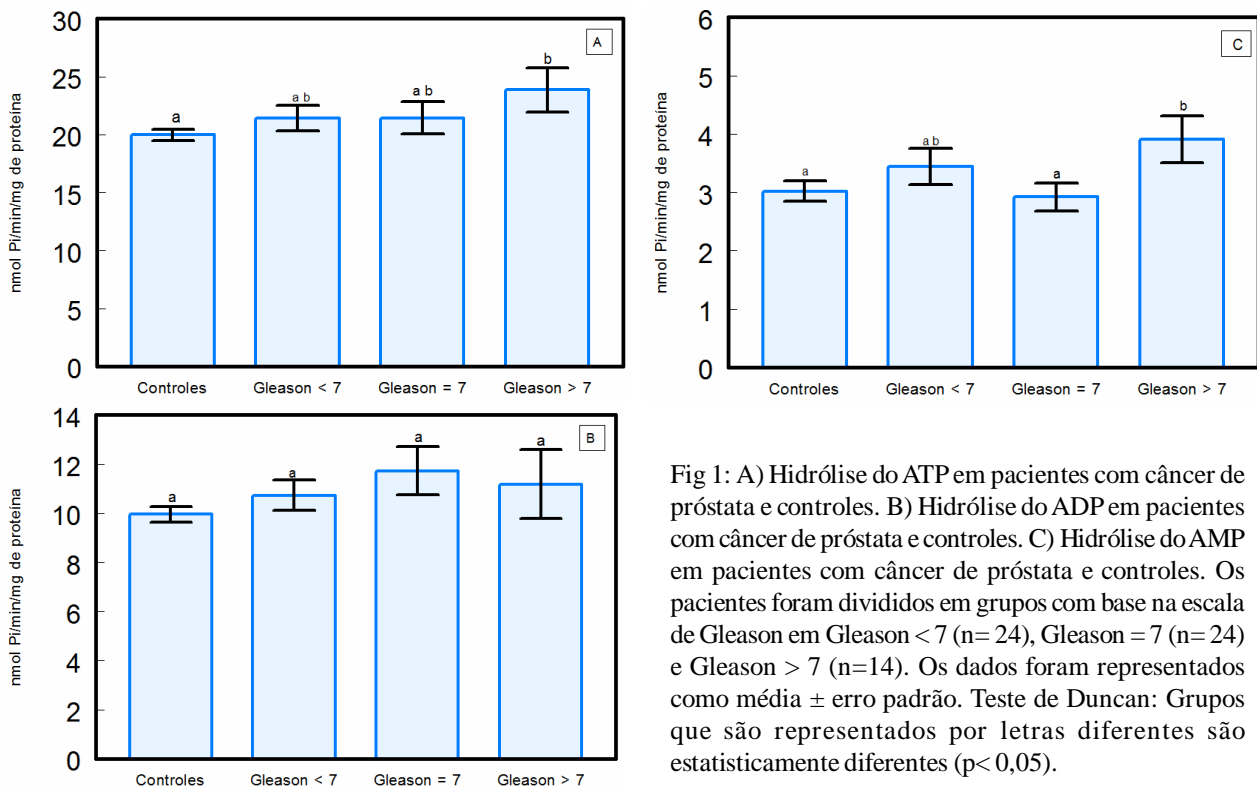
2. *Determinação de proteínas:* A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A leitura foi feita em espectrofotômetro à 595nm.
3. *Determinação das atividade da NTPDase e da 5'-nucleotidase em plaquetas:* A atividade da NTPDase foi determinada por intermédio do método de Pilla et al. (1996). Já a atividade da 5'-nucleotidase foi determinada de acordo com método de Heyman; Reddington; Krentzberg (1984). O fosfato inorgânico liberado através da hidrólise do ATP, ADP e AMP foi medido de acordo com Chan; Delfert; Junguer (1986).
4. *Análise Estatística:* Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (Anova), utilizando teste post-hoc de Duncan ao nível mínimo de 95 % de significância ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os nucleotídeos da adenina e a adenosina possuem papel importante na progressão tumoral (Spychala, 2000). Conforme pode ser observado nas

figuras, houve um aumento na hidrólise do ATP e do AMP em pacientes com câncer de próstata (Gleason > 7). O aumento na atividade da NTPDase no grupo de pacientes classificados na escala de Gleason > 7, ou seja, com doença mais agressiva, sugere que há formação de uma maior quantidade de ADP e AMP nestes pacientes. Além disso, com relação à atividade de hidrólise do AMP, pela ação da enzima 5'-nucleotidase, esta encontrou-se aumentada no grupo de pacientes classificados na escala de Gleason > 7, sugerindo que neste grupo também há uma maior produção de adenosina, a qual é um nucleosídeo presente em altas concentrações durante a progressão tumoral (Spychala, 2000; Borowiec et al., 2006).

Os resultados deste estudo mostram que as atividades das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase estão alteradas nos diferentes padrões de agressividade do câncer de próstata. A atividade da NTPDase pode estar envolvida com o controle da agregação plaquetária e a atividade da 5' – nucleotidase envolvida no controle das concentrações de adenosina. Além disso, considerando que as maiores alterações nas atividades enzimáticas ocorreram nos



pacientes do grupo Gleason > 7, pode-se sugerir que o aumento na hidrólise dos nucleotídeos pode estar diretamente associado aos estágios mais avançados e/ou agressivos do câncer de próstata.

Conclusões

Pode-se sugerir que a adenosina e os nucleotídeos da adenina possuem papel importante na fisiologia do câncer de próstata. A presença de neoplasia pode contribuir para a degradação de nucleotídeos na circulação, refletindo na aumentada atividade da NTP-Dase e 5' - nucleotidase no grupo de pacientes classificados na escala de Gleason > 7. Além disso, o aumento na atividade destas enzimas parece estar associado aos estágios mais agressivos da doença.

Referências

- ARAÚJO, M. C. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochimica et biophysica acta*, 1.740 (2005) 421-426.
- BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta biochimica Polonica* 53 (2006) 269-278.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1976) 218-254.
- CALVETE, A. C. et al. Avaliação da extensão da neoplasia em câncer de próstata: valor do PSA, da percentagem de fragmentos positivos e escala de Gleason. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 49 (2003) 250-254.
- CHAN, K.; DELFERT, K.; JUNGUER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Analytical biochemistry*, 157 (1986) 375-380.
- DONATI, M. B.; FALANGA, A. Pathogenetic mechanisms of thrombosis in malignancy. *Acta Haematologica*, 106 (2001) 18-24.
- GLEASON, D. F. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology*, 1992, 23:273-279.
- HEYMAN, D.; REDDINGTON, M.; KREUTZBERG, G. W. Subcellular localization of 5V-nucleotidase in rat brain. *Journal of neurochemistry*, 43 (1984) 263-273.
- INSTITUTO Nacional do Câncer – Ministério da Saúde (Brasil). *Câncer de próstata*. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer/prostata>>.
- ISHIIA, K. et al. Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn²⁺ axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. *Cancer Letters*, 207, 79-87, 2004.
- MALDONADO, P. A. et al. Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clinical Biochemistry*, 41 (2008) 400-406.
- MARCUS, A. J. et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *Journal of thrombosis and haemostasis*, 1 (2003), 2.497-2.509.
- PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolyase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets*, 7 (1996) 225-230.
- SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & therapeutics*, 87 (2000) 161-173.