



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Filomena Marafon

**Avaliação do perfil oxidativo-inflamatório e de componentes do sistema purinérgico em
pacientes com câncer de cabeça e pescoço**

Florianópolis

2022

Filomena Marafon

**Avaliação do perfil oxidativo-inflamatório e de componentes do sistema purinérgico em
pacientes com câncer de cabeça e pescoço**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Margarete Dulce Bagatini, Dra.
Coorientadora: Prof^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Dra.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marafon, Filomena

Avaliação do perfil oxidativo-inflamatório e de componentes do sistema purinérgico em pacientes com câncer de cabeça e pescoço / Filomena Marafon ; orientadora, Margarete Dulce Bagatini, coorientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza, 2022.

91 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Neoplasias de cabeça e pescoço. 3. Sistema purinérgico. 4. Estresse oxidativo. 5. Adenosina. I. Bagatini, Margarete Dulce. II. Souza, Ariane Zamoner Pacheco de . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Filomena Marafon

Avaliação do perfil oxidativo-inflamatório e de componentes do sistema purinérgico em pacientes com câncer de cabeça e pescoço

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 10 de outubro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Gabriela Gonçalves de Oliveira, Dra.
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Marcelo Farina, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Margarete Dulce Bagatini, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Dedico essa tese a minha família,
E minha pequena filha Eduarda!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Deus, pelo dom da vida, por guiar-me sempre pelos árduos caminhos sem nunca deixar cair, iluminando as escolhas e me sustentando em suas mãos, sendo o meu amparo e refúgio, por toda força, coragem e serenidade a mim concedido para conquistar meus sonhos e realizar esse trabalho!

À minha família, que são a base da minha existência, e a rede de apoio que permitiu o suporte para realização desse estudo, meu esposo Claudinei, meus pais Jacinto e Silvana, minha irmã Fernanda e minha linda filha Eduarda. Amo vocês incondicionalmente!

A minha orientadora e amiga Margarete pelo acompanhamento deste trabalho, pelas ideias, sugestões, pela tranquilidade e prestatividade ao sanar minhas dúvidas, enfim, por tudo! Marga, és um grande exemplo de pesquisadora, mãe e mulher; Te admiro muito!

A minha Coorientadora Ariane, pelos ensinamentos, ideias e sugestões, pelo acolhimento em Florianópolis e em seu laboratório. Ari, és uma profissional e uma mãe incrível, obrigado por tudo!

A minha grande amiga Beatriz, meu grande exemplo pessoal e profissional, pela companhia nessa caminhada e pela sua dedicação e auxílio nesse trabalho. Te adoro amiga!

Aos colegas e amigos que auxiliaram na realização dos protocolos laboratoriais, nas campanhas do Julho Verde e demais etapas desse estudo, minha IC Sabine sempre dedicada e aos demais que contribuíram para concretização desse projeto.

A todos os meus colegas e amigos da CLAB-CH, agradeço pelo convívio, pela amizade, pelo auxílio no trabalho em minha ausência, pela compreensão e por me permitirem ser digna de suas amizades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelas contribuições.

A Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), pela parceria, estrutura e apoio a este trabalho.

Ao corpo docente e servidores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBQA-UFSC), pelas excelentes vivências compartilhadas em cada disciplina, por todo o ensino e contribuição em minha formação acadêmica e pessoal.

A toda equipe de saúde do Hospital Regional do Oeste (HRO, Chapecó), representada pela fonoaudióloga Luciara, que aderiram e permitiram a realização desta pesquisa.

Ao Coral de laringectomizados totais, Grandes Guerreiros do Oeste, pelas experiências e exemplos de vida!

Aos membros da banca examinadora de qualificação e defesa, pelas pertinentes contribuições, as quais melhoraram significativamente a qualidade deste trabalho.

E o mais especial agradecimento a aqueles que são o motivo da execução desse trabalho, a cada paciente e voluntário que aceitou participar desta pesquisa, que confiaram e acreditaram na mesma, e que me ensinaram uma nova percepção do ser humano, e ampliaram meus conceitos de superação, fé e cuidado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração e sucesso desse trabalho.

Muito Obrigado!

“É sobreviver com amor e fé”
(HUNGRIA, Campanha Julho Verde 2022)

RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) compreende um espectro de neoplasias que acometem o trato aerodigestivo superior. O CCP é referido como tumores potencialmente fatais e com baixa sobrevida em decorrência da ausência de biomarcadores de detecção precoce, diagnóstico tardio, propriedades de malignidade, número elevado de recorrências e tratamentos debilitantes, representando um grave problema de saúde pública. Além do comprometimento funcional, esses tumores apresentam inúmeras alterações metabólicas, como alterações inflamatórias, estresse oxidativo e na via de sinalização purinérgica, as quais podem representar um pior prognóstico. Portanto, o referido trabalho teve como objetivo avaliar a atividade das ectoenzimas purinérgicas e marcadores de perfil oxidativo-inflamatório em pacientes com CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe. Para realização do estudo foram recrutados 32 pacientes no Hospital Regional do Oeste (Chapecó, SC) e 33 indivíduos controles saudáveis com características similares ao grupo teste. A avaliação dos indivíduos do estudo foi procedida por formulário de pesquisa, análise do prontuário e análises laboratoriais. Os resultados indicaram maior incidência de CCP em indivíduos do sexo masculino (87,5%), com idade avançada (59,8% com mais de 60 anos), baixa escolaridade (84,4% com o ensino fundamental incompleto) e predominância de tumores na cavidade oral e laringe (50% e 31,3%, respectivamente), tendo a maioria dos pacientes histórico de tabagismo (75%). Os resultados laboratoriais indicaram uma desregulação na via de sinalização purinérgica, onde observa-se um aumento na hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e adenosina monofosfato (AMP) e uma diminuição na desaminação de adenosina em inosina nesses cânceres ($p < 0,05$), associado a um aumento dos níveis de IL-10 e diminuição da atividade da mieloperoxidase ($p < 0,05$), sugerindo um acúmulo de adenosina no ambiente extracelular. Referente aos marcadores de estresse oxidativo observou-se diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase em todos os grupos avaliados, diminuição da atividade da enzima catalase nos pacientes com câncer de cavidade oral e diminuição dos níveis de tióis proteicos em câncer de laringe ($p < 0,05$). Indicou-se também um aumento do dano oxidativo pelo aumento da carbonilação proteica em CCP e câncer de cavidade oral e aumento das concentrações de TBARS em CCP ($p < 0,05$). Ressalta-se também uma importante correlação entre o aumento dos níveis de tióis não-proteicos associado a diminuição de TBARS. Portanto, nossos resultados indicaram importantes alterações na sinalização purinérgica e no perfil oxidativo-inflamatório de pacientes com CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe, sugerindo um possível acúmulo de adenosina nestes tumores, o que corresponde a um desfecho oncológico desfavorável aos pacientes em decorrência do potente efeito imunossupressor dessa molécula, relacionada diretamente com a progressão tumoral, crescimento, invasão, metástase e evasão imunológica. Ademais, observa-se a manutenção de dano oxidativo crônico e comprometimento no sistema de defesa antioxidante endógeno, o que favorece a promoção e progressão tumoral. Desta forma, indica-se que os marcadores analisados podem ser considerados ferramentas de avaliação do prognóstico nestes tumores e futuramente podem ser considerados como possíveis alvos terapêuticos para elaboração de estratégias de manejo e melhora da qualidade de vida dos pacientes com CCP.

Palavras-chave: Neoplasias de cabeça e pescoço; Cavidade bucal; Neoplasias laríngeas; Sistema purinérgico; Estresse oxidativo; Adenosina.

ABSTRACT

Head and Neck Cancer (HNC) comprises a spectrum of neoplasms that affect the upper aerodigestive tract. It is referred to as potentially fatal tumors with low survival resulting from absence of early detection biomarkers, late diagnosis, malignancy properties, high recurrence incidence and weakening treatments, representing a serious public health problem. In addition to functional impairment, these tumors present countless metabolic alterations, such as inflammatory changes, oxidative stress and in the purinergic signaling pathway, which can represent worse prognoses. Therefore, this paper aimed at assessing the activity of the purinergic enzymes and oxidative-inflammatory profile markers in patients with HNC, oral cavity cancer and larynx cancer. In order to conduct this study, 32 patients were recruited at the West Regional Hospital (Chapecó, SC), as well as 33 healthy control individuals with similar characteristics to the test group. Evaluation of the study subjects was by means of a research form, medical chart analysis and laboratory tests. The results indicated higher HNC incidence in male individuals (87.5%), of advanced age (59.8% aged over 60 years old), low schooling levels (84.4% with incomplete Elementary School) and predominance of tumors in the oral cavity and larynx (50% and 31.3%, respectively), with most patients having a smoking history (75%). The laboratory test results indicated certain deregulation in the purinergic signaling pathway, where an increase is observed in adenosine triphosphate (ATP) and adenosine monophosphate (AMP) hydrolysis, as well as a reduction in adenosine deamination into inosine in these types of cancer ($p < 0.05$), associated with an increase in IL-10 levels and a reduction in myeloperoxidase activity ($p < 0.05$), suggesting adenosine accumulation in the extracellular environment. In relation to the oxidative stress markers, a reduction in the activity of the superoxide dismutase enzyme was observed in all groups evaluated, as well as a decrease in the activity of catalase in the oral cavity cancer patients and a reduction in the protein thiol levels in larynx cancer ($p = 0.05$). An increase in oxidative damage due to the increase of protein carbonylation in HNC and oral cavity cancer was also indicated, as well as a rise of the TBARS concentrations in HNC ($p = 0.05$). An important correlation between the increase in the non-protein thiol levels associated with TBARS reduction is also noted. Therefore, our results indicated important alterations in purinergic signaling and in the oxidative-inflammatory profile of patients with HNC, oral cavity cancer and larynx cancer, suggesting possible adenosine accumulation in these tumors, which corresponds to an unfavorable oncologic outcome for the patients as a result of the potent immunosuppressive effect of this molecule, directly related to tumor progression, growth, invasion, metastasis and immunological evasion. In addition, maintenance of chronic oxidative damage and impairment in the endogenous antioxidant defense system are observed, which favors tumor promotion and progression. Consequently, it is pointed out that the markers analyzed can be considered as prognosis evaluation tools in these tumors and that, in the future, they may be considered as possible therapeutic targets to devise strategies targeted at managing the disease and improving Quality of Life in HNC patients.

Keywords: Head and Neck Neoplasms; Oral cavity; Laryngeal neoplasms; Purinergic system; Oxidative stress; Adenosine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sítios anatômicos do CCP	20
Figura 2 – Tipos de câncer de maior incidência no Brasil	20
Figura 3 – Componentes do sistema de sinalização purinérgica	26
Figura 4 – Exposição a fatores de risco desencadeia produção exacerbada de espécies reativas, ocasionando danos às biomoléculas, estresse oxidativo, e promovendo início e progressão da tumorigênese em CCP	40
Figura 5 – Desenho experimental	43
Figura 6 – Atividade das ectoenzimas purinérgicas E-NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA em amostras de linfócitos em pacientes com CCP e indivíduos controles saudáveis, e CCP pré e pós-tratamento	56
Figura 7 – Atividade das ectoenzimas purinérgicas E-NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA em amostras de linfócitos em pacientes com câncer de cavidade oral e câncer de laringe	57
Figura 8 – Concentração de IL-10 e mieloperoxidase	58
Figura 9 – Concentração de interleucinas pró-inflamatórias: IL-6, IL-1 β e TNF- α	59
Figura 10 – Correlação entre a desregulação na atividade das ectoenzimas purinérgicas e os efeitos imunológicos que ocorrem em CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe	60
Figura 11 – Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)	65
Figura 12 – Concentração de tióis proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH)	65
Figura 13 – Conteúdo de ácido ascórbico/vitamina C	67
Figura 14 – Níveis de carbonilação de proteínas	68
Figura 15 – Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	69
Figura 16 – Concentração de proteínas totais	70
Figura 17 – Correlação de variáveis em câncer de cabeça e pescoço (CCP), pré e pós-tratamento	71
Figura 18 – Correlação de variáveis em câncer de cavidade oral e câncer de laringe	71
Figura 19 – Regressão linear de variáveis em câncer de cabeça e pescoço (CCP), pré e pós-tratamento	73
Figura 20 – Regressão linear de variáveis em câncer de cavidade oral e câncer de laringe	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes com CCP e grupo controle	51
Tabela 2 – Características gerais dos pacientes com CCP e grupo controle	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina desaminase
Ado	Adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
BHT	Hidroxitolueno butilado
Ca ²⁺	Cálcio
CAAE	Certificado de apresentação para Apreciação Ética
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CAT	Catalase
CCP	Câncer cabeça e pescoço
CD39	Ectoenzima E-NTPDase-1
CD73	Ectoenzima Ecto-5'-nucleotidase
CMP	Monofosfato de citidina
DAMP	padrão molecular associado a dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4 dinitrofenilhidrazina
DTNB	2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Imunoensaio enzimático
E-NPP	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fator de correção

GPX	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GMP	Monofosfato de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HIF1 α	Fator induzível por hipóxia 1 α
HOCl	Ácido hipocloroso
HPV	Papilomavírus humano
HRO	Hospital Regional do Oeste (Chapecó/SC)
IL	Interleucinas
IMP	Monofosfato de inosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF- γ	Interferon gama
K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
LPO	Lipoperoxidação
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCT4	Monocarboxilato 4
MDA	Malondialdeído
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MMPs	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NIH	Instituto Nacional do Câncer dos EUA, do inglês <i>National Cancer Institute</i>
NK	Células natural killer
NPSH	Tióis não proteicos
NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases
O ₂ •	Ânion superóxido
OH•	Íon hidroxila
ON•	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito

P2X	Receptores P2 ionotrópicos
P2Y	Receptores P2 metabotrópicos
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
Pi3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PLC	Fosfolipase C
PSH	Tióis proteicos
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
RP1	Receptores P1
RP2	Receptores P2
SDS	Lauril sulfato de sódio
SH	Sulfidril
SOD	Superóxido dismutase
SNA	Sistema nervoso autônomo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFK	Tampão fosfato de potássio
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TME	Microambiente tumoral
TMs	Transmembrana
TNF- α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
TNM	Classificação de Tumores Malignos
Treg	Células T reguladoras
Tris-HCL	Tris-hidrocloreto
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer
UMP	Monofosfato de uridina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. OBJETIVOS	18
1.1.1. Objetivo Geral	18
1.1.2. Objetivos Específicos	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.....	19
2.1.1. Definições, contexto histórico e epidemiologia	19
2.1.2. Fatores de risco associados ao CCP	21
2.1.3. Sintomatologia e Diagnóstico	23
2.1.4. Tratamento do CCP	23
2.1.5. Prevenção do CCP	24
2.2. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	25
2.2.1. Definições e contexto histórico	25
2.2.2. Nucleotídeos de adenina e nucleosídeo adenosina	26
2.2.2.1. <i>ATP</i>	27
2.2.2.2. <i>Adenosina (Ado)</i>	28
2.2.3. Receptores P1 e P2	28
2.2.3.1. <i>Receptor P1 (RP1)</i>	29
2.2.3.2. <i>Receptor P2 (RP2)</i>	29
2.2.4. Ectoenzimas	30
2.2.4.1. <i>Ectonucleotidases</i>	30
2.2.4.2. <i>Adenosina desaminase (ADA)</i>	31
2.2.5. O sistema purinérgico e o câncer	32
2.3. ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO	35
2.3.1. Definições	35
2.3.1.1 <i>Espécies reativas e defesas antioxidantes</i>	36
2.3.1.2 <i>Estresse oxidativo – Dano oxidativo</i>	37
2.3.2. O estresse oxidativo, a inflamação e o câncer	37
3. METODOLOGIA	42
3.1. CASUÍSTICA	42
3.2. ANÁLISE DE DADOS.....	43
3.2.1. Avaliação do prontuário	43
3.2.2. Formulário de pesquisa	43
3.3. ANÁLISE LABORATORIAL.....	44
3.3.1. Coleta e processamento do material biológico	44

3.3.1.1. Protocolo de separação de soro, plasma e sangue total com citrato	44
3.3.1.2. Protocolo de separação dos linfócitos.....	44
3.3.2. Avaliação dos componentes do sistema de sinalização purinérgica no sangue periférico.....	45
3.3.2.1. Determinação de proteínas.....	45
3.3.2.2. Atividade da ecto-5'-nucleotidase e E-NTPDase em linfócitos periféricos	46
3.3.2.3. Atividade da ADA em linfócitos periféricos.....	46
3.3.3. Avaliação do Perfil Oxidativo	47
3.3.3.1. TBARS.....	47
3.3.3.2. Mieloperoxidase (MPO)	47
3.3.3.3. Carbonilação de proteínas	48
3.3.3.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).....	48
3.3.3.5. Conteúdo de ácido ascórbico.....	49
3.3.3.6. Tióis proteicos (PSH) e não-proteicos (NPSH).....	49
3.3.4. Parâmetros inflamatórios.....	49
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. PERFIL DOS PACIENTES COM CCP	51
4.1.1. Resultados.....	51
4.1.1.1. Características clínicas	51
4.1.2. Discussão.....	53
4.2. CAPÍTULO 01 – ARTIGO 01	55
4.3. CAPÍTULO 02 – MANUSCRITO 02.....	64
5. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) compreende um conjunto de tumores que acometem o trato aerodigestivo superior, envolvendo as regiões anatômicas da cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe (CHAVES *et al.*, 2018; FERRIS, 2015; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018). Estes tumores são mais frequentes em indivíduos do sexo masculino, com idade mais avançada, hábito de tabagismo, baixa escolaridade e baixo nível socioeconômico (JOHNSON *et al.*, 2021). Constituindo o sexto câncer de maior incidência mundial, o Brasil relata 43 mil novos casos a cada ano, com maiores taxas de incidência na cavidade oral e laringe (BRASIL, 2017, 2019).

Pacientes com CCP enfrentam um diagnóstico potencialmente fatal, associado a tratamentos complexos e debilitantes, além de inúmeros efeitos colaterais e comprometimento funcional, indicando um mau prognóstico para os indivíduos acometidos (BUNBANJERDSUK *et al.*, 2019; COCA-PELAZ *et al.*, 2018). Além das alterações funcionais o paciente com CCP também apresenta um desequilíbrio metabólico e bioquímico que se encontra relacionado diretamente ao desfecho oncológico do tumor. Entre estas alterações tem-se o desenvolvimento de estresse oxidativo, inflamação crônica e alterações na via de sinalização purinérgica.

O sistema purinérgico consiste em uma rede de sinalização celular composta pelos nucleotídeos de adenina e o nucleosídeo adenosina, os quais se ligam aos purinoreceptores para exercer sua atividade sinalizadora. A concentração destes nucleotídeos e nucleosídeo no ambiente extracelular é regulada pela atuação das ectoenzimas purinérgicas (BURNSTOCK, 2006a; BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014). Alterações na via de sinalização purinérgica associadas a diminuição ou aumento da hidrólise dos nucleotídeos pelas ectoenzimas, com acúmulo dos compostos no ambiente extracelular promovem no microambiente tumoral (TME) o crescimento, invasão, metástase e evasão imunológica (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

O quadro de estresse oxidativo e inflamatório crônico associa-se com maior incidência de tumores, uma vez que as espécies reativas e mediadores inflamatórios atuam na iniciação, promoção e progressão tumoral, promovendo sinais de crescimento tumoral, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão e metástase tumoral (FERRAGUTI *et al.*, 2022; JOHNSON *et al.*, 2021).

Desta forma, torna-se relevante o estudo e compreensão dos mecanismos bioquímicos e imunológicos relacionados aos tumores de cabeça e pescoço, com o intuito de verificar variáveis correlacionadas e de maior incidência neste grupo populacional, além de verificar

marcadores laboratoriais que compreendem componentes de sinalização, inflamatórios e de estresse oxidativo que possam ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico e possíveis alvos terapêuticos para elaboração de estratégias futuras de manejo, diagnóstico precoce e melhora da qualidade de vida dos pacientes com CCP.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil oxidativo-inflamatório e componentes do sistema purinérgico em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Identificar a incidência de casos de CCP e perfil da população em estudo;
- Avaliar a atividade das ectoenzimas purinérgicas em linfócitos de pacientes com CCP e em indivíduos controle;
- Analisar marcadores pró-oxidantes e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, em CCP e em indivíduos controle;
- Avaliar os níveis dos marcadores pró e anti-inflamatórios nos grupos em estudo;
- Correlacionar as variáveis do estudo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

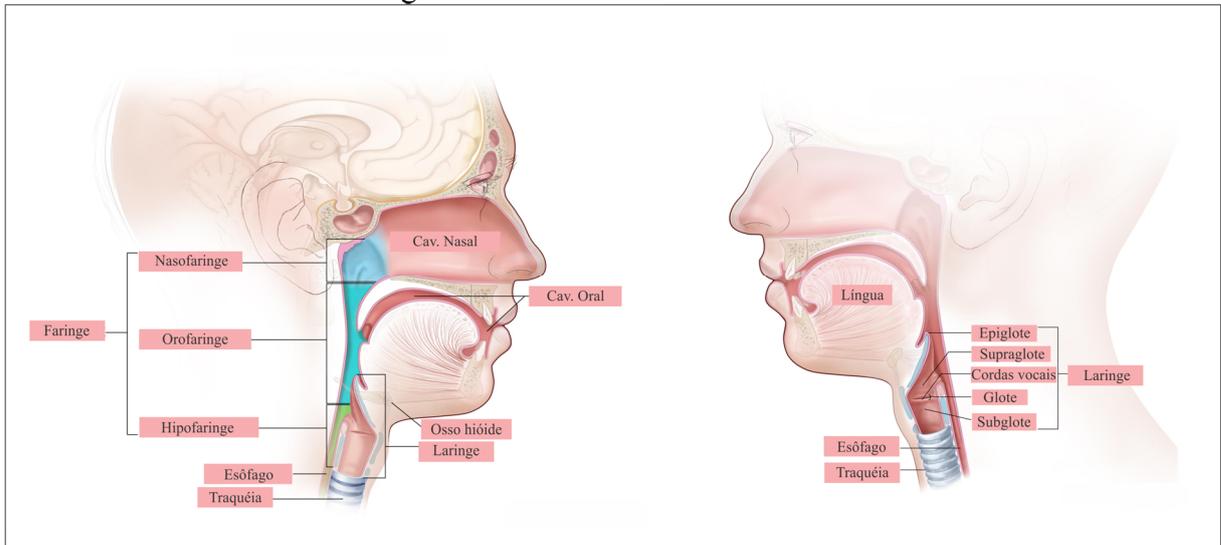
2.1.1. Definições, contexto histórico e epidemiologia

O câncer compreende um conjunto de doenças em que as células se tornam anormais e dividem-se incontrolavelmente, correspondendo a um estado alterado de diferenciação celular que ocasiona a destruição progressiva de tecidos, graves repercussões clínicas, comprometimento funcional e de qualidade de vida dos indivíduos afetados (ARAÚJO NETO; TEIXEIRA, 2017). Mundialmente a incidência e mortalidade por câncer apresentam-se elevadas, fato esse associado ao envelhecimento populacional, mas principalmente ao aumento da exposição a fatores de risco relacionados às condições socioeconômicas das populações (sedentarismo, alimentação inadequada e maior consumo de bebidas alcoólicas), representando uma incidência de 18 milhões de casos de câncer a cada ano e cerca de 9,6 milhões de óbitos, constituindo assim, um grave problema de saúde pública (BRASIL, 2019; NIH, 2019; WHO, 2021).

Entre essas malignidades destaca-se o CCP que compreende um espectro de neoplasias que acometem o trato aerodigestivo superior, envolvendo as regiões anatômicas relacionadas, que incluem cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe, conforme representado na figura 1, sendo o carcinoma espinocelular o subtipo histológico de maior incidência (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018; MASOUDI *et al.*, 2017; NIH, 2019; WEN; GRANDIS, 2015).

Estas neoplasias constituem o sexto câncer de maior frequência mundial, são mais frequente nos países em desenvolvimento e representam cerca de 900 mil casos e 400 mil mortes a cada ano. Sua taxa de mortalidade situa-se entre 40 a 50%, além dos pacientes apresentam baixa sobrevida (cerca de 5 anos) e alto número de recidivas (ALFOUZAN, 2019; ALSAHAFI *et al.*, 2019; CHAVES *et al.*, 2018; GANCI *et al.*, 2017; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019).

Figura 1 – Sítios anatômicos do CCP



Fonte: Adaptado de National Cancer Institute – NIH (2019).

Legenda: Representação esquemática dos sítios anatômicas de incidência de CCP. A figura indica o detalhamento anatômica da faringe e laringe. A cavidade oral não se apresenta detalhada, mas cita-se que a mesma é constituída pelos lábios, dentes, palato, língua, úvula, gengiva, tonsilas e mucosa bucal.

No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam que cerca de 43 mil novos casos de tumores de cabeça e pescoço são registrados a cada ano. Desse grupo de tumores a maior frequência está associada aos cânceres de cavidade oral, cerca de 40%, seguido de laringe com 25% e faringe com 15%, os 20% restante dividem-se entre os sítios remanescentes. O câncer de cavidade oral é o quinto mais frequente em homens, sendo que o câncer de laringe ocupa a nona colocação em relação à frequência excluídos os cânceres de pele não melanoma, conforme representado na figura 2. Para mulheres a incidência é menor, sendo que tumores de cavidade oral e laringe ocupam a 12ª e 16ª colocação, respectivamente (BRASIL, 2001, 2017, 2019).

Figura 2 – Tipos de câncer de maior incidência no Brasil

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Adaptado de BRASIL (2019).

Legenda: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, excluídos os cânceres de pele não melanoma, estimativa para 2020.

O primeiro relato descrito sobre a ocorrência e tratamento de CCP corresponde a um caso de câncer de boca descrito 1650 por Hayes Martin (MARTIN, 1951). Após este relatório inúmeros outros cirurgiões e patologistas descreveram aspectos relacionados a tumores de cabeça e pescoço. Um evento digno de nota foi registrado em 1887, ocasião em que o médico laringologista Morell Mackenzi realizou uma das primeiras biópsias de cabeça e pescoço na laringe do príncipe herdeiro da Alemanha. Os tecidos biopsiados foram examinados pelo médico patologista Rudolph Virchow e indicaram ausência de malignidade (ALFOUZAN, 2019; FECHNER, 2002).

A partir do ano de 1900 observa-se inúmeras descobertas e descrições de tumores benignos e malignos na região da cabeça e pescoço, além da publicação de importantes documentos, como o livro “Histopatologia do ouvido, nariz e garganta” em 1947 por Eggston e Wolff e os atlas de patologia “Tumores de glândulas salivares” e “Patologia otorrinolaringológica” em 1954 e 1956, respectivamente (ALFOUZAN, 2019; FECHNER, 2002). Em 1959 a Patologia Cirúrgica consolidou a relevância clínica desta área com a criação da Sociedade Americana de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. No Brasil a Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço foi fundada em 1967 com o objetivo de atuar e difundir conhecimentos relacionados a temática (FECHNER, 2002; SBCCP, 2018).

O CCP é mais frequente em indivíduos mais velhos, com baixo nível socioeconômico, do sexo masculino e que geralmente apresentam múltiplas comorbidades, frequentemente associadas a hábitos de vida (HOWREN *et al.*, 2013). Pacientes acometidos com essas neoplasias enfrentam além do diagnóstico potencialmente fatal, um importante comprometimento funcional, com déficits e complicações nas funções biológicas de respiração, deglutição e fala (ALFOUZAN, 2019; HOWREN *et al.*, 2013; MACFARLANE *et al.*, 2012). Atualmente, com os avanços no diagnóstico e tratamento, o número de sobreviventes de CCP está aumentando, porém esses pacientes ainda apresentam uma sobrevida global de apenas 5 anos, além do fato desse grupo de tumores apresentar propriedades de alta malignidade e um número elevado de recorrências, indicando assim, um mau prognóstico para os indivíduos acometidos (BUNBANJERDSUK *et al.*, 2019; COCA-PELAZ *et al.*, 2018; GANCI *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2019; NG *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2016).

2.1.2. Fatores de risco associados ao CCP

O desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço apresenta etiologia multifatorial e está associado a alterações e mutações genéticas potencializadas por fatores ambientais. Entre

os fatores genéticos, observa-se a presença de polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de carcinomas e no reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) (GALBIATTI *et al.*, 2013; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; LIGUORI *et al.*, 2018).

Entre os fatores ambientais associados ao CCP destaca-se o tabagismo como principal fator de risco, seguido pelo consumo de álcool. A associação de ambos potencializa a incidência de tumores, indicando um risco 50 vezes maior de desenvolvimento do câncer em relação a não fumantes e não etilista. Observa-se que o uso contínuo dessas substâncias após o diagnóstico corresponde a um fator de mau prognóstico para o tratamento, além de representar um maior risco de recorrência e comprometimento da sobrevida dos pacientes (ALFOUZAN, 2019; FERRAGUTI *et al.*, 2022; HOWREN *et al.*, 2013; LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011).

Atualmente, outro fator de risco que tem apresentado destaque corresponde a infecção ocasionada pelo papilomavírus humano (HPV), que está presente em 25% dos cânceres. O HPV está associado principalmente a ocorrência de tumores de orofaringe, sendo o subtipo 16 o mais incidente, subdividindo estes tumores em dois grupos, os HPV-positivos e HPV-negativos (ALFOUZAN, 2019; LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018; SABATINI; CHIOCCA, 2019; YANG *et al.*, 2019). Além do HPV, observa-se também uma associação do DNA viral do Epstein-Barr com a incidência de tumores nasofaríngeos (ALFOUZAN, 2019).

Ademais à exposição aos agentes cancerígenos citados indica-se uma correlação da incidência de CCP com outros fatores ambientais, entre os quais relata-se a má higiene bucal, formação de placa dentária, perda de dentes, irritação crônica ao revestimento da boca, baixo índice de massa corporal e exposição à radiação ultravioleta, consumo de bebidas muito quentes (chimarrão e chá), consumo de dieta pró-inflamatória (carnes processadas, carnes vermelhas, refrigerantes, etc) e exposição ocupacional. Estes fatores atuam modulando o metabolismo carcinogênico, ocasionando infecções e a liberação de mediadores inflamatórios pró-tumorais (ALFOUZAN, 2019; JOHNSON *et al.*, 2021).

A correlação entre atividade ocupacional e a frequência do CCP indica que atividades ocupacionais manuais ou rurais apresentam maior incidência, associadas principalmente a indivíduos de baixa renda, baixa classe social, baixa escolaridade e desemprego (GALBIATTI *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2021). Castro e colaboradores (2019) avaliaram as ocupações relacionadas ao CCP em uma cidade do sul do Brasil e concluíram que grupos ocupacionais do comércio, construção e limpeza, manutenção de residências, hotéis e edifícios apresentaram

maior número de casos de câncer de cavidade oral e orofaringe, corroborando com os relatos de maior incidência dos tumores em indivíduos de baixa renda.

2.1.3. Sintomatologia e Diagnóstico

A sintomatologia em pacientes com CCP depende principalmente da localização do tumor, incluindo na maioria dos casos disfagia, disfonia, afonia, aumento dos linfonodos cervicais, presença de feridas e/ou úlceras não cicatrizantes na cavidade oral, presença de sangramento nasal, obstrução nasal, epistaxe, otite média serosa, prevalência de dor persistente, associados a um estado de desnutrição (MACFARLANE *et al.*, 2012; GOVENDER *et al.*, 2015; HOWES *et al.*, 2018; ALFOUZAN, 2019).

O diagnóstico do CCP é realizado por meio da anamnese aliado aos exames de imagem, teste para infecção por HPV e confirmação por biópsia. A ausência de biomarcadores de diagnóstico precoce devido a heterogeneidade tumoral pode levar a um diagnóstico tardio acarretando em comprometimento da qualidade de vida dos pacientes (MARUR; FORASTIERE, 2016; CHAVES *et al.*, 2018; ALFOUZAN, 2019).

2.1.4. Tratamento do CCP

O tratamento de pacientes com CCP geralmente é multimodal e inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia (cetuximabe e cisplatina), de forma individual ou concomitante. A definição da metodologia empregada depende da localização, estadiamento do tumor primário, resultados oncológicos e funcionais esperados e a toxicidade do tratamento (JOHNSON *et al.*, 2021; WEN; GRANDIS, 2015).

Tumores em estágio inicial geralmente são tratados com a modalidade de única terapêutica, com emprego de cirurgia ou radioterapia, obtendo-se um prognóstico favorável. Tumores em estágio avançado requerem a combinação terapêutica associada a abordagem profissional multidisciplinar (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; ALSAHAFI *et al.*, 2019).

Outra terapia empregada para estes tumores inclui a imunoterapia, tendo como alvo componentes moleculares específicos associados ao desenvolvimento do tumor, como exemplo cita-se o anticorpo monoclonal direcionado ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o qual tem apresentando resultados oncológicos favoráveis (GALBIATTI *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2018).

Atrasos no início ou na continuidade do tratamento são preditores de pior prognóstico aos pacientes (CHAVES *et al.*, 2018). Normalmente o tratamento em CCP é complexo e

debilitante, associado a inúmeros efeitos colaterais, incluindo o comprometimento de funcionalidades, como o comer, engolir, respirar e falar. Esses pacientes também podem apresentar perda de paladar e olfato, diminuição sensorial, boca seca, dor e inchaço residual, desfiguração facial e incapacidade funcional (HOWREN *et al.*, 2013; WEN; GRANDIS, 2015; ALSAHAFI *et al.*, 2019).

2.1.5. Prevenção do CCP

A incidência de CCP apresenta-se associada a indivíduos de baixa renda, analfabetismo, falta de conhecimento e informações relacionadas a doença, diagnóstico tardio, falta de acesso à serviços de saúde e infraestrutura precária, o que promove inúmeros desafios para a gestão desses cânceres. Neste contexto, a implantação de programas de saúde que visam estes fatores e a prevenção dos tumores objetiva a melhora da qualidade de vida dos indivíduos diagnosticados e proporciona um melhor prognóstico (JOSHI *et al.*, 2014; KONINGS *et al.*, 2020).

As medidas preventivas para o CCP incluem a cessação do tabagismo, limitação da ingestão alcoólica, evitar a exposição à fumaça do tabaco e demais agentes cancerígenos ambientais, detecção e vacinação ao HPV, manutenção de boa saúde bucal, bons hábitos alimentares e gerenciamento do estresse (ALFOUZAN, 2019; JOHNSON *et al.*, 2021; SABATINI; CHIOCCA, 2019). A dieta também se correlaciona à prevenção da doença, sendo que o consumo de vegetais, frutas e alimentos que contêm carotenoides, e baixo consumo de carne vermelha estão associados à redução do risco de desenvolvimento dos tumores (GALBIATTI *et al.*, 2013; HOWES *et al.*, 2018).

O CCP é referido como um conjunto de tumores potencialmente fatais e com baixa sobrevida em decorrência da ausência de biomarcadores de detecção precoce, devido à heterogeneidade desses tumores, e conseqüentemente diagnóstico tardio, propriedades de malignidade dos tumores, número elevado de recorrências, mau prognóstico e tratamentos debilitantes. Desta forma, torna-se imprescindível a busca da compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos, associados a inflamação e ao estresse oxidativo, e de potenciais biomarcadores biológicos de diagnóstico e estratificação dos pacientes, entre os quais pode-se destacar o mecanismo de sinalização purinérgica, os quais já tem apresentado propriedades sinalizadoras em inúmeros tumores, com intuito de possibilitar melhores resultados e qualidade de vida aos indivíduos acometidos com CCP.

2.2. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

2.2.1. Definições e contexto histórico

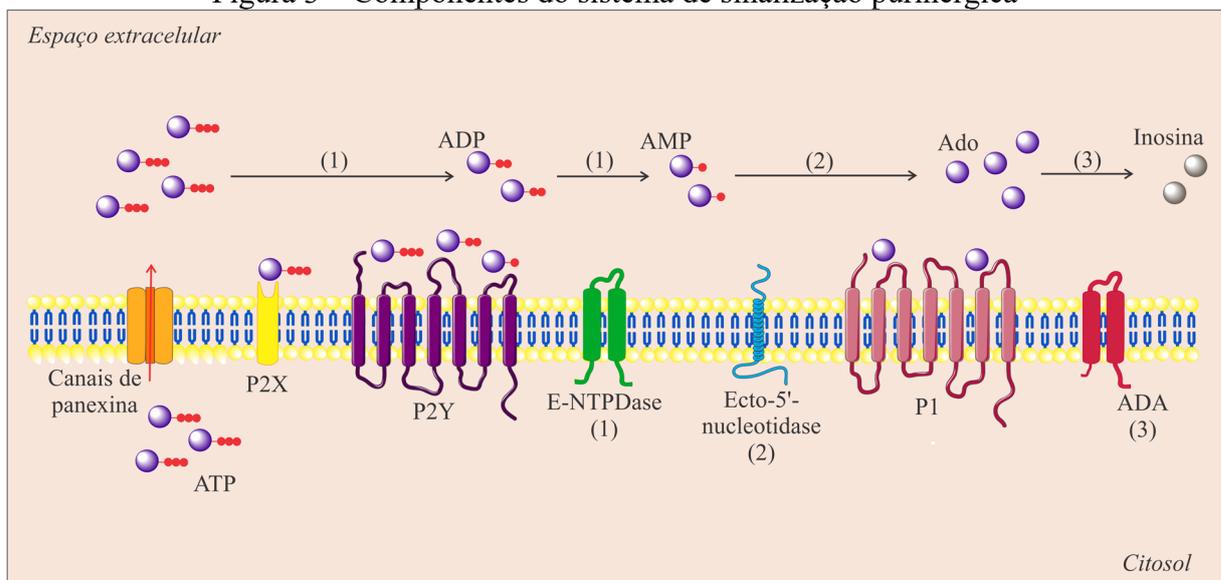
As purinas extracelulares tiveram sua função descrita pela primeira vez em 1929 por Drury e Szent-Gyorgyi em uma pesquisa que relatava as atividades dos compostos de adenina no coração dos mamíferos. Em 1972, Burnstock descreveu o conceito de sinalização purinérgica. Com base em suas pesquisas, o pesquisador demonstrou a liberação de substâncias ativas no sistema nervoso autônomo (SNA), as quais não estavam vinculadas ao sistema adrenérgico ou colinérgico, indicando assim, a presença de outra rede de sinalização, a purinérgica. Evidências experimentais subsequentes demonstraram que o trifosfato de adenosina (ATP) atuava como transmissor ou co-transmissor e relataram a identificação de receptores extracelulares que desempenhavam funções fisiológicas induzidas pelas purinas, sendo os receptores purinérgicos P1 e P2 descritos em 1978 por Burnstock (BURNSTOCK, 1972; ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1994; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

O sistema de sinalização purinérgica compreende uma rede de sinalização celular, a qual representa uma importante via moduladora de inúmeros processos fisiológicos, entre os quais pode-se citar a modulação da resposta inflamatória e imunológica, atuando também na neurotransmissão e neuroproteção, na secreção exócrina e endócrina, no mecanismo da dor, na agregação plaquetária e tromborregulação, na vasodilatação mediada pelo endotélio, na proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2006b, 2006a; MARTINS *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2012, 2017).

Existem três grupos de componentes executores deste sistema (biomoléculas, receptores e enzimas), cita-se inicialmente as biomoléculas, sendo estas os nucleotídeos, que compreendem componentes formados de uma base nitrogenada, um grupo fosfato e uma ribose ou desoxirribose, sendo esta base nitrogenada derivada de adenina, guanina, citosina, uracila ou timina; e os nucleosídeos, que compreendem a biomolécula na ausência do grupo fosfato. Apesar de todas as biomoléculas serem atuantes no sistema purinérgico, o presente trabalho tem como enfoque os nucleotídeos de adenina (ATP, difosfato de adenosina – ADP e monofosfato de adenosina – AMP), e o nucleosídeo adenosina (Ado). Di Virgilio e colaboradores (2019) descreveram que além dos nucleotídeos citados, outros constituem-se como relevantes para esta sinalização, incluindo o uridina trifosfato (UTP), uridina difosfato (UDP) e UDP-açúcares (BURNSTOCK, 2018; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017; GIULIANI, SARTI, DI VIRGILIO, 2019).

Os nucleotídeos e nucleosídeos se ligam a receptores purinérgicos do grupo P1 e P2 para exercer sua atividade biológica sinalizadora, sendo que a função destes e o controle da sinalização são regulados por um conjunto de ectoenzimas, entre as quais cita-se as ectonucleotidases (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase – E-NPP, ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases – E-NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e fosfatases alcalinas) e a adenosina desaminase (ADA) (BURNSTOCK, 1997, 2018; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017). Indica-se que essas biomoléculas purinérgicas são degradadas sucessivamente até o metabólito inativo inosina; para sua eliminação, a inosina por sua vez é convertida em hipoxantina, a qual é oxidada a xantina e se converte, em ácido úrico, o qual é excretado para o meio extracelular (BOURS *et al.*, 2006). Os componentes do sistema purinérgico e a atuação das ectoenzimas e purinoreceptores sobre as biomoléculas está representado na figura 3.

Figura 3 – Componentes do sistema de sinalização purinérgica



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Representação esquemática dos componentes da sinalização purinérgica. Em situações de dano celular o ATP intracelular é liberado para o meio extracelular, principalmente através dos canais de panexina. No espaço extracelular ocorre a ligação do ATP aos receptores para transdução do sinal e efetivação das suas funções. O ATP pode-se ligar aos receptores P2X e P2Y, ADP e AMP ligam-se ao receptor P2Y, e o nucleosídeo Ado liga-se aos receptores do tipo P1 (A1, A2a, A2b e A3). Após realização de suas funções fisiológicas, as purinas extracelulares, pela ação das ectoenzimas, são hidrolisadas. O ATP é hidrolisado a ADP e depois AMP pela atuação da E-NTPDase (1). O ATP também pode ser hidrolisado diretamente a AMP pela atuação da E-NPP. O AMP é hidrolisado em Ado pela atuação da ecto-5'-nucleotidase (2). A Ado é desaminada em inosina pela ação da ectoenzima ADA (3).

2.2.2. Nucleotídeos de adenina e nucleosídeo adenosina

Os nucleotídeos extracelulares compreendem o ATP, ADP e AMP, juntamente com o nucleosídeo de Ado, os quais estão associados a uma diversidade funcional, atuando como mensageiros extracelulares e sinalizando uma diversidade de efeitos biológicos no meio

extracelular (BURNSTOCK, 2006b). Ressalta-se que as biomoléculas de ATP e Ado apresentam um número maior de relatos na literatura e encontram-se amplamente associadas a inúmeras condições fisiológicas e patológicas, como o câncer (BURNSTOCK, 2017).

2.2.2.1. ATP

O ATP é um nucleotídeo que intracelularmente atua como molécula energética na fosforilação oxidativa, promovendo a liberação de energia quando degradado sucessivamente em ADP e AMP. Após a liberação, o ATP sofre rápida degradação enzimática por ectonucleotidases, o que é funcionalmente importante porque os metabólitos do ATP também atuam como ligantes fisiológicos em uma diversidade de receptores purinérgicos. No meio extracelular, o ATP apresenta atuação como sinalizador extracelular seletivo, pode-se dizer que este componente atua como sinalizador de dano denominado de padrão molecular associado a dano (DAMP). Atuando como DAMP, o ATP promove o recrutamento, preparação e ativação de células estromais, células imunes e inflamatórias (BURNSTOCK, 2006b; DI VIRGILIO et al., 2018; DI VIRGILIO; VUERICH, 2015).

O mecanismo de ação dessa biomolécula extracelularmente dependente da sua concentração fisiológica, local de ação e receptor, podendo apresentar atividades diferenciadas conforme o meio, como exemplo cita-se atividades pró e anti-inflamatórias. Quando o ATP encontra-se em baixas concentrações e promove a ligação a receptores do tipo P2Y, localizados em abundância nas superfícies dos linfócitos, essa biomolécula promove efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, inibindo a proliferação de células T, promovendo um *downregulation* na liberação de citocinas pró-inflamatórias, estimulando uma resposta Th2 e liberação de citocinas anti-inflamatórias. Quando essa biomolécula apresenta-se em maior quantidade extracelularmente promove efeitos pró-inflamatórios, estimulando os linfócitos, promovendo secreção de interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (INF- γ), bem como o recrutamento de monócitos, secreção de interleucina 1-beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelos macrófagos, migração de células dendríticas, atuando assim na indução da resposta imune a antígenos estranhos (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015; SOUZA et al., 2017).

Ao interagir com receptores amplamente distribuídos no SNC o ATP atua na neurotransmissão. Este nucleotídeo também estimula a síntese de DNA na medula óssea e nos tímócitos, mas inibe essa síntese no baço, linfonodos e linfócitos periféricos. Essa biomolécula apresenta efeitos citostáticos e citotóxicos em determinadas linhagens tumorais; promove a liberação de histamina de mastócitos e de grânulos destes e dos neutrófilos, inibindo assim, a função de macrófagos e células *natural killer* (NK); atua na proliferação e crescimento celular;

e para as células do sistema imune esta biomolécula também atua como direcionador nos casos de lesão tecidual (BURNSTOCK, 2006a; BURNSTOCK, 2009).

2.2.2.2. Adenosina (Ado)

A Ado é um nucleosídeo formado pela ligação de uma adenina a uma ribose, atuando no meio extracelular como sinalizadora na via das purinas. Esse nucleosídeo é um sinalizador de dano celular, mediando ações anti-inflamatórias e sendo uma potente molécula imunossupressora; desempenhando também um papel protetor através da liberação de neurotransmissores; atua no estímulo a migração celular, na apoptose, necrose e proliferação celular; atuação na motilidade intestinal; inibe a agregação plaquetária e atua como vasodilatador. Reconhecidamente a Ado atua na condução cardíaca e pressão arterial exercendo uma função protetora no coração; essa biomolécula também promove regulação endógena da imunidade inata e defesa nas lesões teciduais extensas associadas à inflamação (ARAB; HADJATI, 2019; BAGATINI *et al.*, 2018a; BOURS *et al.*, 2006; CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020; DI VIRGILIO; VUERICH, 2015; YEGUTKIN; BOISON, 2022).

A Ado está vinculada a uma variedade de processos fisiológicos, como metabolismo, inflamação, respiração e dor, os quais são dependentes da ligação da mesma aos receptores acoplados a proteína G, promovendo o aumento ou diminuição dos níveis de AMP cíclico (AMPC) e conseqüentemente direcionando a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) ou fosfolipase C (PLC), provendo seus efeitos biológicos. Os estudos indicam que na maioria das situações fisiológicas e patológicas a Ado liga-se preferencialmente aos receptores A2a e A2b, desencadeando o efeito imunossupressor. A Ado também medeia efeitos biológicos cruciais por meio de mecanismos independentes do receptor, neste caso, com base nas vias bioquímicas intracelulares, afetando reações de metilação e as vias de sinalização relacionadas (ARAB; HADJATI, 2019; BOISON; YEGUTKIN, 2019; JADIDI-NIARAGH, 2019; YEGUTKIN; BOISON, 2022).

2.2.3. Receptores P1 e P2

Os receptores purinérgicos compreendem o local onde as biomoléculas serão acopladas para realização da transdução do sinal e efetivação das suas funções. Atualmente utiliza-se a divisão dos receptores conforme definido por Abbracchio e Burnstock (1994).

2.2.3.1. Receptor P1 (RP1)

RP1 são receptores metabotrópicos, ou seja, receptores transmembrana que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução no interior da célula, cujo agonista endógeno é a Ado (BARNARD; BURNSTOCK; WEBB, 1994; SCHACHTER *et al.*, 2015). Este grupo de receptores está ligado à proteína G e é composto por quatro subtipos (A1, A2a, A2b e A3), que apresentam similaridade estrutural e são amplamente distribuídos pelo organismo. Assim, como todos os representantes desta superfamília, esses receptores apresentam 7 segmentos transmembrana (TMs), com o terminal amino voltado para o meio extracelular, e o terminal carboxil intracelularmente (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020).

Os receptores de Ado promovem a ativação da MAPK, levando à sobrevivência, crescimento celular e diferenciação, e modulam a atividade da adenilato ciclase, enzima esta que promove a regulação da concentração intracelular de AMPc. Os subtipo de receptores A1 e A3 são acoplados à subunidade Gi que regula negativamente o AMPc inibindo a adenilato ciclase, promovendo ativação celular; indica-se que o receptor A1 é descrito também como um sensor do estresse oxidativo. Por outro lado, os receptores A2a e A2b são acoplados à subunidade Gs que estimula a adenilato ciclase a regula positivamente o AMPc, atuando assim como imunossupressores e suprimindo as respostas celulares atuando no controle da inflamação (BURNSTOCK, 2018; BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014; THURAIYAH *et al.*, 2022). Destaca-se que esses receptores são amplamente expressos pelas células imunes da linhagem mieloide e linfoide, sendo que os receptores A2a são altamente expressos em neutrófilos e linfócitos T periféricos, enquanto os receptores A2b são amplamente expressos em células endoteliais vasculares (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015).

2.2.3.2. Receptor P2 (RP2)

Os RP2 compreendem receptores com um sistema de comunicação célula a célula altamente plásticos e versáteis, devido as suas diferentes seletividades e afinidades de nucleotídeos. Por apresentarem múltiplas vias de transdução intracelular ativadas e também pela presença de nucleotidases de membrana plasmática muito ativas, estes receptores apresentam-se divididos em dois grupos, os ionotrópicos ou P2X e os metabotrópicos, ou P2Y. O grupo de receptores P2Y apresenta estrutura semelhante aos RP1, ou seja, possui 7 segmentos TMs e acoplamento à proteína G. Esse grupo possui oito subtipos de clones descritos na literatura (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14), cujos agonistas são as pirimidinas e as purinas, ligando-se ao ATP, ADP e AMP. Entre os subtipos de receptores cita-se os que se acoplam

predominantemente com Gq (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11) ativando a PLC, e os demais que se acoplam a proteína Gi (P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) promovendo a inibição da adenilil ciclase e regulação dos canais iônicos. Desta forma, estes receptores modulam a sinalização pela regulação dos níveis intracelulares de AMPc, desencadeando assim seus mecanismos de transdução de sinal (BAGATINI *et al.*, 2018a; BARNARD; BURNSTOCK; WEBB, 1994; BURNSTOCK, 1997, 2006a; DI VIRGILIO *et al.*, 2018).

Os receptores P2X apresentam uma estrutura formada por duas alfa-hélices transmembrana ligadas por uma longa alça extracelular, incluindo sete subunidades clonadas e sequenciadas descritas na literatura (P2X1-7). A maioria destes receptores está distribuída nos neurônios centrais e periféricos, e tem como agonista principal o ATP. Quando o ATP realiza a estimulação dos receptores P2X, ocorre a despolarização celular, e sequencialmente a abertura do canal iônico permeável a sódio (Na⁺), potássio (K⁺) ou cálcio (Ca²⁺), promovendo o influxo e efluxo desses íons e iniciando assim as funções celulares pela ativação de cascatas de sinalização em diferentes tipos celulares (BARNARD; BURNSTOCK; WEBB, 1994; BURNSTOCK, 2006b; DI VIRGILIO *et al.*, 2018). A expressão dos purinoreceptores P2Y e P2X em células imunes e inflamatórias promove a modulação de respostas-chave, como quimiotaxia e liberação de citocinas (BARNARD; BURNSTOCK; WEBB, 1994; DI VIRGILIO; BOREA; ILLES, 2001). Entre esses receptores indica-se uma subclassificação, sendo esta: receptores de dessensibilização rápida (P2X1 e P2X3), receptores de dessensibilização lenta ou não dessensibilizante (P2X2, P2X4 e P2X7) e aqueles não funcionais em condições nativas (P2X5 e P2X6). Alguns destes receptores (P2X7, P2X2 e P2X4) também estimulam a abertura de poros e captação de moléculas orgânicas (DI VIRGILIO *et al.*, 2018).

2.2.4. Ectoenzimas

As ectoenzimas purinérgicas compreendem enzimas que regulam a concentração extracelular de ATP e Ado. Desta forma, são relevantes para os diversos processos fisiológicos nos quais as biomoléculas são atuantes e sinalizadoras. A atuação destas ectoenzimas compreende a hidrólise dos nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos, após estes realizarem suas funções, constituindo um eficiente mecanismo de controle destes (YEGUTKIN, 2008; MARTINS *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017).

2.2.4.1. Ectonucleotidases

Este grupo de enzimas apresenta-se ancorada à membrana celular, com o sítio ativo voltado ao ambiente extracelular, podendo estar presente também em forma solúvel no meio

intersticial, sendo composto pela família das E-NPP, E-NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e fosfatases alcalinas (BURNSTOCK, 2017)

Os componentes do grupo das E-NTPDases compreendem 8 membros, E-NTPDases 1–8, os quais hidrolisam tanto ATP quanto ADP apresentando algumas preferências individuais conforme o subtipo, formando conseqüentemente AMP. Os subtipos 1, 2, 3 e 8 promovem hidrólise na superfície celular, enquanto os subtipos 4, 5, 6 e 7 estão associadas a organelas intracelulares (YEGUTKIN; BOISON, 2022). As funções associadas às E-NTPDases incluem o controle dos linfócitos, reconhecimento dos antígenos, ativação de funções efetoras das células T citotóxicas e geração de sinais que aumentam as interações célula-célula. A E-NTPDase-1 (CD39) é uma das ectoenzimas com maior expressão na superfície de células T reguladoras (Treg) e apresenta uma alta atividade catalítica quando ligado aos receptores de células T (BAGATINI *et al.*, 2018a; SCHACHTER *et al.*, 2015).

A ecto-5'-nucleotidase (CD73) é composta por sete isoformas que promovem a hidrólise do AMP em Ado, sendo cinco isoformas citossólicas, uma localizada na matriz mitocondrial e outra relacionada à membrana plasmática. O AMP é o substrato mais eficientemente hidrolisado pela CD73, mas a mesma pode hidrolisar também monofosfato de citidina (CMP), monofosfato de uridina (UMP), monofosfato de inosina (IMP), monofosfato de guanosina (GMP), até seus respectivos nucleosídeos. Essa ectoenzima encontra-se associada à maturação e ativação dos linfócitos, e sua expressão está relacionada à resistência de algumas linhagens de células tumorais a agentes quimioterápicos. Essa ectoenzima tem função sinalizadora e atua em processos de adesão célula-célula e célula-matriz. A ecto-5'-nucleotidase, juntamente com as E-NTPDases atua com o objetivo de reduzir os níveis de ATP extracelular (ALLARD *et al.*, 2019; ALLARD; CHROBAK; STAGG, 2016; BAGATINI *et al.*, 2018a; BONO *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2018).

2.2.4.2. Adenosina desaminase (ADA)

A ectoenzima ADA tem como função promover a desaminação da Ado em inosina, que compreende um metabólito inativo, e sua deficiência contribui para condições patológicas devido ao aumento anormal das concentrações de adenosina extracelular (MARTINS *et al.*, 2016). A ADA apresenta três isoformas (1, 2 e 3), amplamente distribuídas nos tecidos animais; a isoforma ADA1 apresenta maior concentração nos tecidos e atua também como reguladora das concentrações de Ado; a ADA2 por sua vez, tem maior concentração no soro atuando exclusivamente neste com seu papel metabólico (BAGATINI *et al.*, 2018a; PASSOS *et al.*, 2018).

A ADA pode ser considerada uma proteína multifuncional, desempenhando vários papéis e regulando importantes sistemas biológicos, atuando com grande atividade no timo, tecidos linfoides e em linfócitos periféricos, promovendo o crescimento normal dos linfócitos, além de sua diferenciação e proliferação (BURNSTOCK, 2006a, 2009). A atividade da ADA pode estar alterada em várias condições patológicas, incluindo síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), anemia, linfomas, tuberculose e leucemia (BAGATINI *et al.*, 2018a, 2018b). A deficiência dessa enzima ocasiona o acúmulo de subprodutos tóxicos da degradação de purinas, afetando mais potentemente os linfócitos, ocasionando à imunodeficiência combinada grave em adenosina desaminase. Embora os efeitos descritos na literatura são mais notáveis em linfócitos, outras manifestações podem resultar do acúmulo dos metabólitos da via das purinas, incluindo anormalidades esqueléticas, alterações no desenvolvimento neurológico e manifestações pulmonares associadas à proteinase pulmonar-alveolar, podendo ocasionar insuficiência pulmonar (FLINN; GENNERY, 2018).

2.2.5. O sistema purinérgico e o câncer

Os componentes purinérgicos são descritos como presentes e correlacionados a inúmeros tumores, estando amplamente distribuídos no TME, ambiente este que compreende as interações entre células cancerosas e células não malignas. Para tal, a composição estrutural, celular e bioquímica deste espaço está amplamente associada à modulação do metabolismo, migração, proliferação das células cancerígenas e resposta imune do hospedeiro. Desta forma, estudar a composição celular e a interação de componentes nesse ambiente, como as biomoléculas purinérgicas, torna-se cada vez mais importante, pois os efeitos ocasionados podem favorecer o crescimento tumoral, invasão e evasão imune (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020).

O ATP é descrito como um dos principais constituintes bioquímicos do TME, sendo que esta biomolécula atua nos receptores purinérgicos P2 expressos nas células tumorais e hospedeiras. A estimulação destes receptores P2 apresenta efeito diferencial, pois é dependente da concentração extracelular de ATP, do subtipo do receptor P2 (P2X e P2Y) envolvido e do tipo de célula alvo. Os receptores P2 são expressos por praticamente todos os tumores (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013; DI VIRGILIO *et al.*, 2018).

Entre os receptores P2X, o subtipo de receptor P2X7 é amplamente estudado e indicado como primordial nas interações entre células hospedeiras e tumorais. Estudos pré-clínicos em vários modelos de tumores mostraram que o direcionamento de P2X7 constitui uma estratégia de interesse para eficácia do tratamento anticâncer, sendo que atualmente já existem inibidores

de pequenas moléculas potentes e seletivos direcionados ao receptor P2X7. Ao ligar-se com o receptor P2X7, o ATP promove aumento intracelular de Na^+ e Ca^{2+} e ativação de vias sinalizadoras da PI3K, proteína cinase B (AKT), fator indutível por hipóxia 1 α (HIF1 α) e fator nuclear kappa B (NF- κ B), sendo que essas vias convergem com o objetivo de direcionar a expressão genética para apoiar a proliferação de células cancerígenas. A ativação desse receptor também promove efluxo de K^+ , modulando a atividade do inflamossoma (DE MARCHI *et al.*, 2019; DI VIRGILIO *et al.*, 2018, 2020; PFAFFENZELLER; FRANCIOSI; CARDOSO, 2020). As células tumorais liberam quantidades elevadas de ATP em resposta a deformações mecânicas, hipóxia, necrose e isquemia, indicando uma correlação deste nucleotídeo com a promoção do TME (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

O ATP também pode ligar-se a receptores P2Y. O receptor P2Y1 atua como promotor de proliferação, os receptores P2Y11 e P2Y5 das células cancerígenas promovem estímulo à diferenciação celular. A ativação do P2Y2 permite a transmigração de células cancerígenas do sangue para o espaço extravascular, promovendo metástases. O ATP também estimula a liberação de metaloproteinases da matriz (MMPs). Estas enzimas promovem degradação da matriz extracelular e invasão de células tumorais, permitindo a entrada dessas na circulação sanguínea, contribuindo assim, extensivamente para a progressão tumoral (DI VIRGILIO *et al.*, 2018).

Relata-se também que as interações do microambiente com os tumores compreendem um fator relevante para a evolução tumoral, tornando imunossupressor o meio neoplásico. Em decorrência da atividade imunossupressora descrita da Ado, indica-se que a atuação do sistema purinérgico na degradação de seus compostos até a adenosina relaciona-se diretamente com a progressão tumoral, devido ao aumento da imunossupressão (CHEW; TOH; ABASTADO, 2012; ANTONIOLI *et al.*, 2013; THURAIYAH, 2022).

Estudos *ex vivo* indicam um acúmulo cerca de 30% maior de Ado no núcleo tumoral em relação à periferia e, um acúmulo duas vezes maior desta nos tumores do que nos tecidos saudáveis, indicando correlação desse nucleosídeo com a manutenção do TME, promovendo crescimento, invasão, metástase e evasão imunológica (MELLO; COUTINHO-SILVA; SAVIO, 2017; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017; ARAB; HADJATI, 2019). A hidrólise sequencial do ATP extracelular realizada pelas ectoenzimas CD39 e CD73 é a principal via para a geração de Ado no interstício do tumor, sendo que o direcionamento da atividade da ecto-5'-nucleotidase e dos receptores do tipo P1 (principalmente A2a e A2b), diminuindo a Ado extracelular, possibilita a diminuição da imunossupressão e inibe o crescimento do tumor (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017). Considera-se que a sinalização de Ado emergiu como uma via

metabólica chave na regulação da imunidade tumoral e portanto, apresenta potenciais alvos terapêuticos em sua via para atuação como antagonistas de *checkpoints* imunológicos (LEONE; EMENS, 2018).

A Ado promove formação de AMPc, efeitos pró-tumorais, entre os quais cita-se mecanismos de evasão imunológica, estímulo a angiogênese em tumores sólidos hipóxicos, manutenção do fluxo sanguíneo intratumoral, remodelação da matriz, resultando na proliferação de células endoteliais humanas, expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), metástase, desregulação da apoptose, polarização de macrófagos M2, estimulação de células imunossupressoras, como células T reguladoras e células derivadas de mieloides, supressão de células apresentadoras de antígenos, células T efectoras, células NK e células T CD8⁺ e promoção da sobrevivência em células cancerosas (ALLARD; CHROBAK; STAGG, 2016; ARAB; ALIZADEH; ASGHARZADE, 2021; ARAB; HADJATI, 2019; BOISON; YEGUTKIN, 2019; DE LEVE; WIRSDÖRFER; JENDROSSEK, 2019; JADIDI-NIARAGH, 2019; LEONE; EMENS, 2018; VIGANO *et al.*, 2019; VIJAYAN *et al.*, 2017; YEGUTKIN; BOISON, 2022).

Além das funções imunorreguladoras, a via das ectonucleotidases atua contribuindo na modulação do crescimento, diferenciação, invasão, migração e metástase de células cancerígenas, indicando que a E-NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase representam um marcador de prognóstico e progressão aos pacientes com câncer. Desta forma, essas duas ectonucleotidases são amplamente estudadas como reguladores do ponto de verificação imunológico e alvos terapêuticos para a terapia do câncer (ANTONIOLI *et al.*, 2013; RIPPHAUSEN *et al.*, 2012; VIVIANI *et al.*, 2020; YEGUTKIN; BOISON, 2022).

Ademais os nucleotídeos atuam extracelularmente como sinalizadores de dano, podendo atuar na sinalização tumoral (BURNSTOCK, 2006a; DI VIRGILIO; VUERICH, 2015). Inúmeros estudos na literatura indicam uma correlação desse mecanismo sinalizador e as concentrações de seus componentes no meio extracelular com o desfecho oncológico, incluindo estudos com o câncer de mama, pulmão e melanoma cutâneo (MANICA *et al.*, 2018; MÂNICA *et al.*, 2019; SCHETINGER *et al.*, 2007; ZANINI *et al.*, 2012, 2019).

No CCP, em modelo animal, Ye e colaboradores (2014) indicaram um aumento dos níveis extracelulares de ATP e uma correlação com a presença de dor. Theodoraki *et al.* (2018) propuseram que os mecanismos de evasão imunológica do CCP correlacionaram com acúmulo de Ado. Ludwig *et al.* (2020) também indicaram níveis elevados de Ado em exossomos isolados do plasma de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, sendo este um indicativo de progressão da doença. Devido à escassez de pesquisas que permitam a

compreensão da interação e atuação dessa sinalização frente aos tumores de cabeça e pescoço, indica-se a relevância dos estudos relacionados na busca de compreensão desses componentes, que poderão futuramente representar possíveis alvos farmacológicos para melhora da qualidade de vida dos pacientes com CCP.

2.3. ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO

2.3.1. Definições

Conforme Sies (1985) o estresse oxidativo corresponde a “um distúrbio no equilíbrio antioxidante e pró-oxidante em favor das espécies oxidantes, levando a danos potenciais”, ou seja, um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e a capacidade antioxidante de eliminá-las, onde se observa uma produção exacerbada destas moléculas reativas e/ou uma falha das defesas antioxidantes (SIES, 2015; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

O estresse oxidativo ocorre concomitantemente com quadros inflamatórios crônicos, nos quais há resposta inflamatória extensiva, prolongada e sem regulação. Durante a inflamação as citocinas atuam no recrutamento de leucócitos pela quimioatração e aumento da expressão de moléculas de adesão celular, promovendo a resposta de infiltração celular, ativação celular e respostas sistêmicas. Esses fatores podem atuar promovendo a inflamação ou suprimindo o estado inflamatório. Cita-se as interleucinas (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e IFN- γ como principais citocinas pró-inflamatórias e as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) como principais citocinas anti-inflamatórias. Em um quadro de desequilíbrio as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias ocorre a perda do controle homeostático da resposta inflamatória, com potencial dano ao organismo (BAGATINI *et al.*, 2017; BRENNER *et al.*, 2014; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; LIGUORI *et al.*, 2018; TAMPA *et al.*, 2018; THOMPSON *et al.*, 2015).

A presença de um quadro de estresse oxidativo e inflamação crônica é relatado como determinante para o início e progressão de diferentes doenças agudas e crônicas. Nesta situação ocorre uma maior expressão de oncogenes, geração de compostos mutagênicos, promoção de atividade aterogênica, ocorrência de placa senil, podendo desencadear aterosclerose, diabetes *mellitus*, obesidade, envelhecimento precoce, transtornos neurodegenerativos e câncer (ALFADDA; SALLAM, 2012; BAGATINI *et al.*, 2017; BRENNER *et al.*, 2014; CANNAVÒ *et al.*, 2019; FORMAN; URSINI; MAIORINO, 2014; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; LIGUORI *et al.*, 2018)

2.3.1.1 Espécies reativas e defesas antioxidantes

ERO e ERN correspondem a radicais reativos e derivados não radicalares de oxigênio e nitrogênio, respectivamente. Estas espécies reativas são produzidas por todas as células aeróbias, sendo que as principais fontes endógenas de espécies reativas incluem as mitocôndrias, pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, mieloperoxidase (MPO), lipoxigenase e angiotensina II, e as principais fontes exógenas correspondem a poluição do ar e da água, tabaco, álcool, metais pesados ou de transição, drogas (por exemplo, ciclosporina, tacrolimus, gentamicina e bleomicina), solventes industriais, culinária (por exemplo, carne defumada, óleo residual e gordura) e radiação. Entre as espécies reativas cita-se que grandes quantidades de radical ânion superóxido (O_2^\bullet) são formados pelas fontes endógenas, sendo que boa parte deste é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), o qual pela reação de Fenton forma o íon hidroxila (OH^\bullet), sendo este extremamente reativo com fosfolipídios de membranas e com proteínas. O H_2O_2 em presença da enzima MPO e cloreto pode também ser convertido em ácido hipocloroso (HOCl), o qual é extremamente prejudicial às proteínas celulares. Entre as ERN as principais formas correspondem ao óxido nítrico (ON^\bullet) e ao ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), os quais podem danificar macromoléculas intracelulares, incluindo ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e ácidos nucleicos (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; LIGUORI *et al.*, 2018; PERILLO *et al.*, 2020; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Fisiologicamente as ERO e ERN exercem suas funções de sinalização e demais funções fisiológicas, porém o controle do quantitativo das mesmas nos ambientes celulares é crucial para a vida celular. Para tal, as células possuem um sistema de eliminação complexo destas espécies reativas, baseado principalmente em um sistema de defesa antioxidante endógeno enzimático, que inclui as superóxido dismutases (SODs), localizadas no citoplasma, mitocôndria e na matriz extracelular; glutathione peroxidase (GPX); glutathione redutase (GR); peroxirredoxina; tioredoxina; e a catalase (CAT). Além das enzimas citadas, outros compostos atuam na eliminação das ERO e ERN, que compreendem os antioxidantes não enzimáticos e os antioxidantes exógenos, estes últimos devem ser ingeridos por meio da dieta, e entre esses podemos citar a vitamina C, vitamina E, os carotenoides, os polifenóis, os flavonoides e uma diversidade de minerais (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; MUTLU *et al.*, 2018; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

2.3.1.2 Estresse oxidativo – Dano oxidativo

Em condições patológicas de desequilíbrio ocorre o aumento da produção de ERO e ERN e falha ou incapacidade de eliminação pelos sistemas antioxidantes. Conseqüentemente tem-se um quadro de estresse oxidativo que leva a danos oxidativos caracterizados pela modificação irreversível das macromoléculas biológicas incluindo a modificação das suas estruturas e modulação das suas funções, que compreendem:

- Danos oxidativos aos carboidratos;
- Danos aos ácidos nucléicos, pela reticulação da proteína do DNA, ruptura de cordas e alteração na estrutura das bases nitrogenadas, podendo ocasionar fragmentação e mutação dessa biomolécula, além de destruição do genoma;
- Oxidação proteica, carbonilação proteica e oxidação de tióis ocasionando a perda da atividade das proteínas, inibição da atividade enzimática, desativação de receptores; e
- Peroxidação lipídica, que ocasiona impactos a estrutura das membranas, ocasionando perda da integridade destas, além da formação de aldeídos reativos e da migração descontrolada de compostos bioativos (DHAMA *et al.*, 2019; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; KRUK; ABOUL-ENEIN, 2017; LIGUORI *et al.*, 2018; NEGANOVA *et al.*, 2021; PISOSCHI; POP, 2015).

2.3.2. O estresse oxidativo, a inflamação e o câncer

Relata-se uma associação entre o aumento do estresse oxidativo e o quadro inflamatório crônico e uma maior incidência de tumores, isso ocorre em decorrência dos agentes carcinogênicos promoverem estados inflamatórios e conseqüentemente a produção de EROs (THOMPSON *et al.*, 2015). O desenvolvimento do câncer corresponde a ação de múltiplos eventos que ocorrem em uma única célula, e é constituído por três estágios: iniciação, promoção e progressão, as ERO encontram-se envolvidas em todas essas etapas, e seu efeito é diretamente proporcional ao tipo e à reatividade dos radicais envolvidos. Na etapa de iniciação tem-se as mutações do DNA, sendo que as espécies reativas atuam potencialmente nas modificações oxidativas do DNA. A promoção corresponde a expansão clonal das células, pela indução da proliferação celular e/ou inibição da apoptose, as EROs promovem estímulo a expansão de clones por modulação de genes que estão relacionados à proliferação ou morte celular e regulando a atividade de fatores de transcrição, que controlam o crescimento celular e a oncogênese. No estágio de progressão tumoral quantidades elevadas de EROs contribuem por promoverem mutação, inibir antiproteinases, e lesar tecidos locais, sendo cruciais também para

resposta angiogênica e potencial metastático (KATAKWAR *et al.*, 2016; KRUK; ABOUL-ENEIN, 2017).

O dano oxidativo ocasionado ao DNA, o qual ocorre principalmente no estágio inicial de iniciação da carcinogênese, é resultante da desaminação das bases nitrogenadas e oxidação da guanina que promove a quebra das fitas, modificações e reticulação, apresentando um efeito oncogênico por meio de replicação, transcrição e tradução alteradas. Este dano pode promover alterações nos principais genes supressores tumorais (como TP53 e CDKN2A) e mutações nos genes codificadores NRF2 (NFE2L2) e KEAP1 (KEAP1), os quais são reguladores do processo de estresse oxidativo, acentuando o mesmo. As ERO e ERN atuam no microambiente tumoral induzindo dano também as proteínas e lipídios, sendo que o quadro de peroxidação lipídica produz compostos genotóxicos e mutagênicos, como crotonaldeído, acroleína, 4-hidroxi-2-nonenal e malondialdeído (MDA), que têm a capacidade de interagir com proteínas e DNA. O aumento da concentração destes produtos em pacientes com câncer como indicadores de risco pré-maligno do processo de carcinogênese. As EROs também promovem a liberação de fatores angiogênicos, como o VEGF, atuando além do desenvolvimento, na progressão do câncer (ALFOUZAN, 2019; AUSONI *et al.*, 2016; BRENNER *et al.*, 2014; JOHNSON *et al.*, 2021; THOMPSON *et al.*, 2015).

A presença de células inflamatórias geralmente precede o desenvolvimento do tumor, indicando que a inflamação desempenha um papel causal na tumorigênese, sendo que a persistência do estado pró-inflamatório, com liberação de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas), promove alterações progressivas na composição celular e molecular do microambiente. Desta forma, a inflamação constitui um processo facilitador para vários tipos de câncer, atuando em diferentes vias etiológicas e promovendo a progressão tumoral, sendo estas vias o aumento da formação de adutos de DNA, angiogênese aumentada, distúrbios na função mitocondrial, produção exacerbada de ERO e ERN, sinalização celular cruzada, sinalização anti-apoptótica alterada com evasão da apoptose e desregulação da vigilância imunológica frente ao tumor (BRENNER *et al.*, 2014; THOMPSON *et al.*, 2015).

Concomitante ao processo inflamatório, os carcinógenos químicos e a inflamação promovem a produção de um nível muito elevado de ERO e ERN que supera a capacidade de pelos sistemas antioxidantes exógenos e endógenos mostra-se ineficiente. Ressalta-se que como as espécies reativas atuam fisiologicamente na regulação de diversas vias de transdução de sinais, uma produção exacerbada destas, promove ativação e progressão tumoral, agindo em sinais de crescimento tumoral, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão e metástase tumoral (HAYES;

DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; MAIA; SANTOS; REIS, 2014; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020; SILVA; JASIULIONIS, 2014).

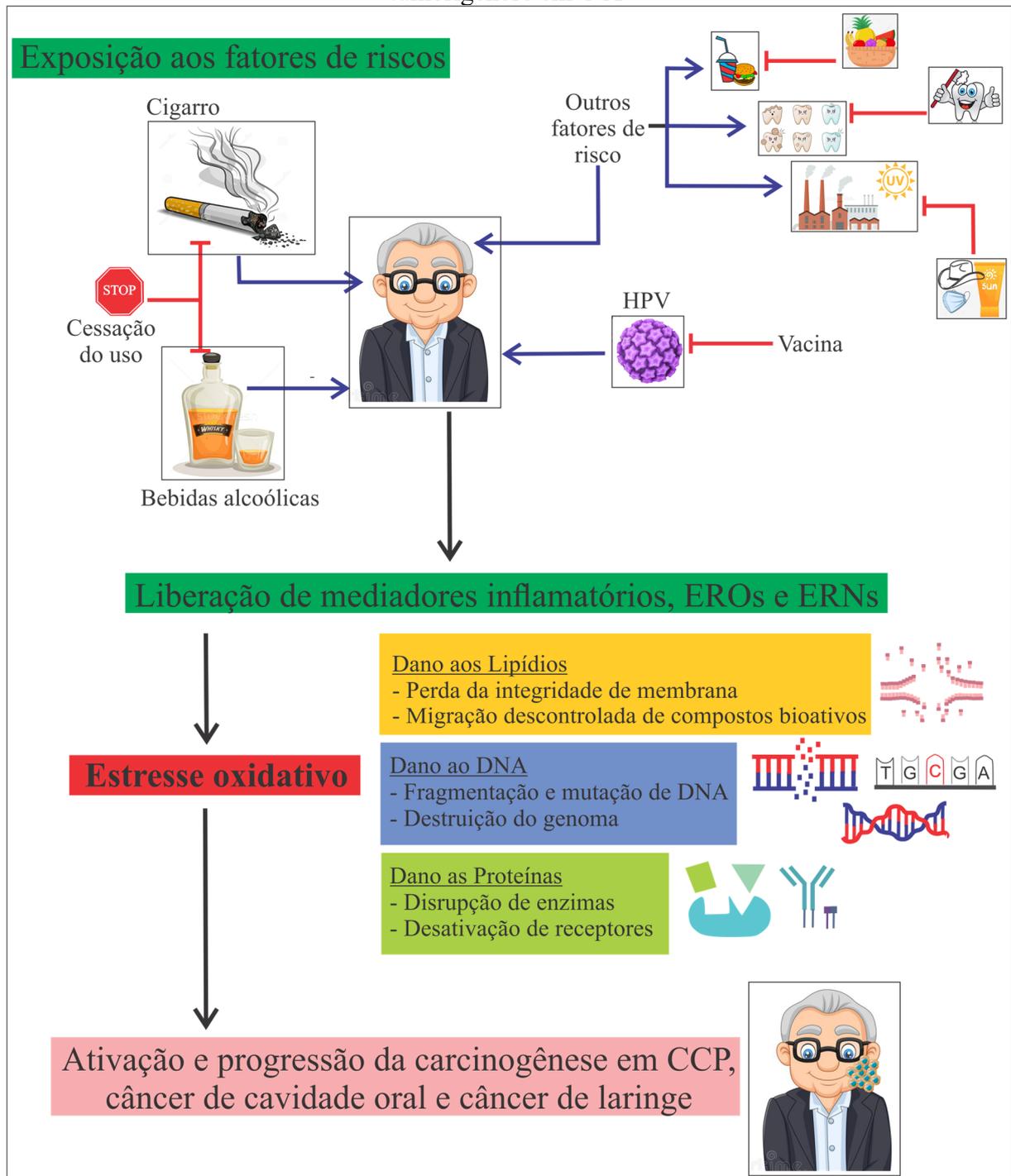
Indica-se também que pacientes com diagnóstico de neoplasias produzem mais espécies reativas em decorrência de uma redução da ingestão e má absorção de nutrientes, maior suscetibilidade a infecções, além da ação da terapia antineoplásica frente a lise tumoral, sendo que esse aumento exacerbado de espécies reativas pode representar um pior prognóstico a esses indivíduos (ALFADDA; SALLAM, 2012).

O desenvolvimento desse quadro de ativação inflamatória, imunológica e de estresse oxidativo em CCP, está intrinsecamente relacionado a exposição à fatores de risco ambientais (Figura 4), entre os quais cita-se principalmente o uso do tabaco, consumo de álcool e infecção pelo HPV. Esses estressores ambientais induzem mudanças agudas ou crônicas na homeostase redox, promovendo inflamação e transformação neoplásica (ALFOUZAN, 2019; AUSONI *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2019; JOHNSON *et al.*, 2021).

Evidências experimentais e clínicas indicam que as EROs produzem uma ampla gama de efeitos tumorais pelos danos anteriormente citados (AUSONI *et al.*, 2016). Ressalta-se que a inibição dos principais fatores ambientais de iniciação e progressão do tumor gera benefícios de sobrevida para pacientes em qualquer estágio do CPP, pois as EROs, conforme descrito, atuam todos os estágios da etiologia tumoral. Alterações na produção de EROs estão associadas a mecanismos de resistência à terapêutica tradicional, sendo que a desregulação desse metabolismo redox também é responsável pelos efeitos colaterais que mais afetam a qualidade de vida dos pacientes com CCP (como a mucosite oral, xerostomia) (CHEN *et al.*, 2018; DOMINGO-VIDAL *et al.*, 2019; MIRANDA-GALVIS *et al.*, 2021).

Evidências científicas indicam que compostos antioxidantes podem auxiliar o prognóstico de CCP e de outros tumores, principalmente aqueles provenientes de frutas e vegetais, que possuem elevado teor de compostos bioativos categorizados em fitoquímicos (por exemplo, fenólicos, flavonoides, carotenoides), micronutrientes (vitaminas e minerais) e fibras. Cita-se que compostos ricos em polifenóis (como framboesas, mirtilos, frutos vermelhos, uva, etc) possuem propriedades anti-inflamatórias, são reguladores imunológicos e atuam como antioxidantes, reduzindo a produção de EROs e conseqüentemente protegendo contra o estresse oxidativo, favorecendo o reparo do DNA e estimulando a transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes, correspondendo assim, a uma estratégia coadjuvante efetiva para manejo desses pacientes (MIRANDA-GALVIS *et al.*, 2021).

Figura 4 – Exposição a fatores de risco desencadeia produção exacerbada de espécies reativas, ocasionando danos às biomoléculas, estresse oxidativo, e promovendo início e progressão da tumorigênese em CCP



Fonte: A autora (2022).

Legenda: A figura relata a exposição aos principais fatores de risco para câncer de cabeça e pescoço (CCP) e medidas preventivas para interromper essa exposição, o que consequentemente cessará o dano promovido por estes fatores. Entre estes fatores cita-se: o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas, ao qual relata-se como prevenção a cessação do consumo; à exposição ao vírus HPV, que tem como prevenção a vacinação; o consumo de dieta pró-inflamatória e ultraprocessada, indicando-se como prevenção o consumo de alimentos naturais ricos em compostos bioativos, como fitoquímicos, polifenóis e antioxidantes; a presença de dano bucal como placa dentária, perda de dentes e irritação crônica ao revestimento da boca, ao qual indica-se como prevenção a manutenção de uma boa higiene bucal e dentária; e a exposição ocupacional e a radiação ultravioleta, para o qual indica-se a utilização de equipamentos de proteção individual como medidas preventivas. A exposição a estes

fatores de risco desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, e produção e liberação exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que associado a dificuldade ou falha dos sistemas de defesa antioxidantes ocasiona o quadro de estresse oxidativo. O estresse oxidativo promove danos às biomoléculas, incluindo danos aos lipídios (peroxidação lipídica, que ocasiona impactos a estrutura das membranas, ocasionando perda da integridade destas, formação de aldeídos reativos e migração descontrolada de compostos bioativos), aos ácidos nucléicos (reticulação das proteínas do DNA, ruptura de cordas e alteração na estrutura das bases nitrogenadas, ocasionando fragmentação e mutação dessa biomolécula, além de destruição do genoma) e danos às proteínas (oxidação proteica, carbonilação proteica e oxidação de tióis, perda da atividade das proteínas, disrupção de enzimas e desativação de receptores). Os danos ocasionados pelo estresse oxidativo promovem a ativação e progressão da carcinogênese em CCP, câncer de cavidade e câncer de laringe.

3. METODOLOGIA

3.1. CASUÍSTICA

A presente pesquisa compreende um estudo clínico descritivo e quantitativo com um grupo teste constituído de pacientes com CCP atendidos pelo Hospital Regional do Oeste (HRO) de Chapecó/SC, provenientes dos 37 municípios da região oeste do Estado de Santa Catarina e um grupo controle constituído de indivíduos saudáveis com características similares de gênero e idade ao grupo teste e recrutados aleatoriamente no Município de Chapecó.

Para execução da pesquisa aplicou cálculo amostral para populações finitas, com uma projeção de atendimento de 150 pacientes em um período de 6 meses, com nível de confiança de 95% e um erro máximo de 15%, obteve-se um tamanho amostral de 34 pacientes, sendo o grupo controle constituído pelo mesmo número amostral do grupo teste.

Os critérios de inclusão na pesquisa compreenderam idade superior a 20 anos, de ambos os gêneros e diagnosticados com tumores de cabeça e pescoço. Para o grupo controle foram incluídos indivíduos saudáveis com idade superior a 20 anos. A exclusão da pesquisa ocorreu no caso de indivíduos que não possuíam prontuário de atendimento e acompanhamento ou que apresentavam outro tipo de câncer não relacionado ao CCP.

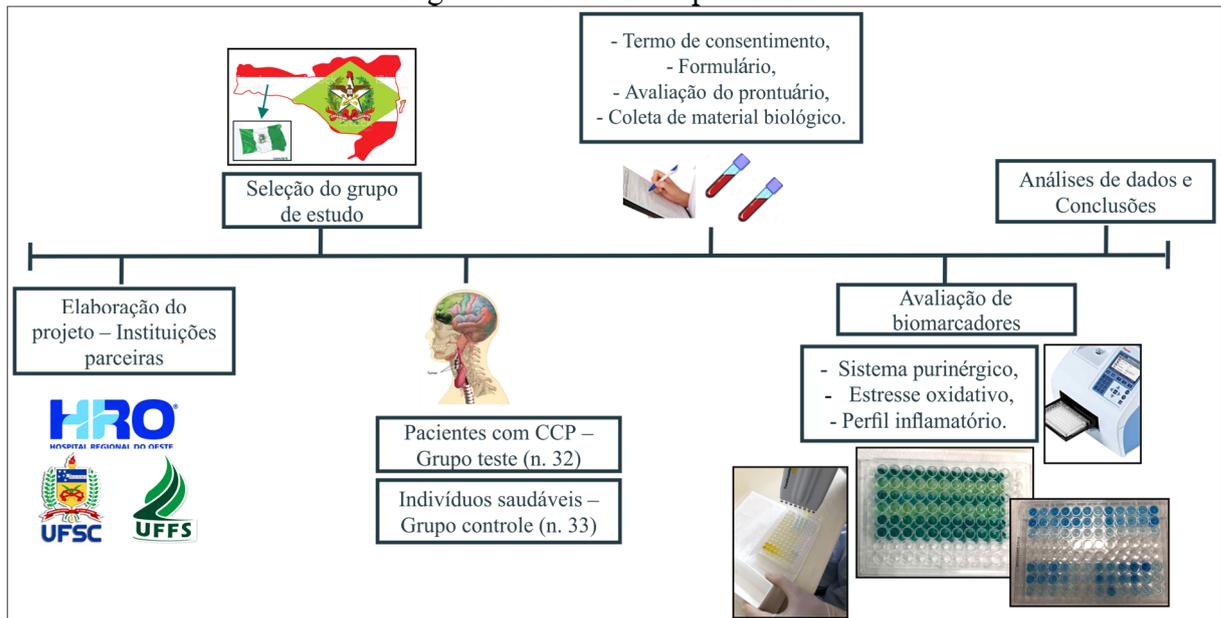
O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Instituição de Ensino, seguindo os preceitos legais da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, conforme Certificado de apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 03057018.6.0000.5564 e número do parecer de aprovação 3.039.713.

O recrutamento dos participantes ocorreu no decorrer de 2019, com início no mês de fevereiro. Os sujeitos foram informados sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa, as dúvidas esclarecidas e procedido o convite à participação voluntária do estudo, sendo que todos os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Inicialmente 40 pacientes foram recrutados no HRO e após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, o grupo teste foi constituído por 32 indivíduos com CCP, e o grupo controle por 33 indivíduos, totalizando 65 indivíduos participantes da pesquisa.

A Figura 5 representa o desenho experimental do presente estudo, incluindo um resumo das etapas que foram e serão executadas no decorrer desta pesquisa.

Figura 5 – Desenho experimental



Fonte: A Autora (2022).

Legenda: Representação esquemática do desenho experimental desta pesquisa.

3.2. ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados conforme as seguintes ferramentas: prontuário, formulário de pesquisa e protocolos laboratoriais.

3.2.1. Avaliação do prontuário

Realizou-se a avaliação do prontuário dos pacientes para obtenção de dados relacionados à sua situação de saúde/doença, incluindo a verificação de terapia medicamentosa e protocolo de tratamento empregado, utilização de medicação contínua, localização do tumor e presença de recidivas. Os dados obtidos foram tabulados e analisados.

3.2.2. Formulário de pesquisa

Realizou-se entrevista presencial ao grupo teste e controle por meio de formulário impresso elaborado pelos pesquisadores com o intuito de coletar dados de identificação (nome, data de nascimento), dados demográficos (idade), dados socioeconômicos (escolaridade, profissão) e outras variáveis relevantes. As variáveis adicionais incluíram a utilização de medicação contínua, presença de doenças crônicas, fatores de risco associado aos tumores (hábito de fumar e hábito de ingestão de bebidas alcoólicas) para ambos os grupos e o tempo de diagnóstico, terapia empregada, utilização de terapia alternativa associada ao tratamento convencional e histórico familiar para o grupo teste. As respostas obtidas foram transcritas em tabelas e analisadas, permitindo traçar o perfil dos indivíduos acometidos pelo CCP.

3.3. ANÁLISE LABORATORIAL

3.3.1. Coleta e processamento do material biológico

As amostras foram coletadas por punção venosa antero-cubital, em tubos de sangue total com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), citrato de sódio e tubos sem anticoagulante e com gel para separação do soro. O procedimento foi realizado por profissional capacitado na área, garantindo a privacidade e sigilo dos indivíduos.

Todo o procedimento de coleta das amostras biológicas, manipulação e descartes de resíduos infectantes foram executados em consonância com as normas de biossegurança. Sequencialmente as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com blocos de gelo reciclável e encaminhadas ao laboratório de Bioquímica da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) para processamento das mesmas.

3.3.1.1. Protocolo de separação de soro, plasma e sangue total com citrato

O tubo contendo gel separador foi centrifugado em centrífuga modelo Sigma 3-16L a uma rotação de 3.500 rpm por 15 minutos. Após centrifugação o soro obtido foi acondicionado em criotubo e guardado em ultrafreezer Indrel IULT 335D-486 à -80°C para realização das análises laboratoriais.

O tubo contendo EDTA foi centrifugado a uma rotação de 3.500 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante contendo o plasma foi guardado em um criotubo no ultrafreezer à -80°C para posterior realização das análises.

Um dos tubos contendo amostra e anticoagulante citrato de sódio foi homogeneizado por inversão e a partir do sangue total deste frasco separou-se um volume de 500 µL em um criotubo e armazenou-se nas condições acima descritas. O tubo contendo o anticoagulante EDTA foi posteriormente encaminhado para o protocolo de separação de linfócitos.

3.3.1.2. Protocolo de separação dos linfócitos

Para separação da camada de linfócitos utilizou-se a metodologia adaptada de Böyum (1968).

Procedeu-se a colocação da camada de leucócitos obtida do tubo com EDTA em tubo falcon, ao qual adicionou-se volume equivalente de solução fisiológica 0,9% (salina), fechou-se o tubo e homogeneizou-se levemente. Em outro tubo colocou-se 2 mL do reagente Ficoll® e a este adicionou-se levemente pelas bordas a amostra diluída em solução fisiológica, o tubo

foi centrifugado a uma rotação de 1.800 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação observou-se a formação de um gradiente, contendo uma camada de células mononucleares entre as camadas do reagente e do plasma. Procedeu-se a retirada desta camada de células em tubo falcon vazio, adicionando sequencialmente 10 mL de solução fisiológica, o tubo foi tampado e centrifugado à 1.500 rpm por 15 minutos. Após este procedimento o sobrenadante foi descartado por inversão, e ao precipitado adicionou-se 5 mL de salina e realizou-se centrifugação à 1.200 rpm por 10 minutos. Novamente, descartou-se o sobrenadante por inversão e ao precipitado contendo os linfócitos adicionou-se 1mL de solução fisiológica e realizou-se centrifugação à 1.000 rpm por 5 minutos. Após a última centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de salina, sendo a amostra guardada em ultrafreezer à -80°C para realização dos protocolos analíticos.

3.3.2. Avaliação dos componentes do sistema de sinalização purinérgica no sangue periférico

Para avaliação dos componentes do sistema de sinalização purinérgica foram utilizadas as amostras de linfócitos dos indivíduos em estudo. Para mensuração da hidrólise do ATP em ADP e AMP pela avaliação da atividade das ectoenzimas E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, foi mensurada a quantidade de fosfato inorgânico liberado através de ensaio colorimétrico, com leitura em espectrofotômetro a 630 nm, utilizando o método de Pilla *et al.* (1996) adaptado por Lunkes *et al.* (2003) e a desaminação da Ado pela avaliação da atividade da ADA foi determinada através da quantidade de amônia liberada pela ação da enzima com leitura em espectrofotômetro a 620 nm, segundo o método descrito por Giusti e Galanti (1984) conforme procedimentos analíticos padronizados no laboratório.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América – EUA). Os reagentes utilizados compreenderam os substratos do sal dissódico de ATP, sal de sódio de ADP, sal de sódio AMP, adenosina, Ficoll-Histopaque® e reagente de Coomassie, obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), sendo todos os demais reagentes utilizados no experimento de grau analítico e alta pureza.

3.3.2.1. Determinação de proteínas

Para avaliação do sistema purinérgico as amostras de linfócitos foram descongeladas e determinou-se o quantitativo de proteínas utilizando-se o método de Bradford (1976). O protocolo analítico foi realizado utilizando o reagente de Coomassie, a partir do qual realizou-

se curva padrão em triplicata com albumina bovina, procedendo as leituras em espectrofotômetro UV/VIS 5300PC, da Metash, a 595 nm, e obteve-se o fator de correção (FC). Para dosagem de proteína das amostras adicionou-se em um tubo de ensaio 2.500 µL do reagente e 50 µL de amostra, sendo calculadas as concentrações.

As concentrações de proteínas das amostras foram normalizadas entre 0,1-0,2 mg/mL, para amostras de linfócitos. Valores acima da faixa determinada foram diluídos com solução salina.

3.3.2.2. Atividade da ecto-5'-nucleotidase e E-NTPDase em linfócitos periféricos

Para determinação da atividade da E-NTPDases preparou-se a solução de incubação utilizando-se cloreto de sódio (NaCl) 1,2 M, glicose 60 mM, cloreto de potássio (KCl) 50 mM, tris-hidrocloreto (Tris-HCL) 500 mM (pH 7,4), cloreto de cálcio (CaCl₂) 50 mM e água destilada, a qual foi adicionada em triplicata no volume de 160 µL em cada cavidade da placa juntamente com 20 µL das amostras e pré-incubada à 37°C por 10 minutos. Ao retirar a placa do banho-maria adicionou-se 20 µL do substrato (ATP/ADP 10 mM) e incubou-se por 70 minutos, após este período adicionou-se 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) 15%, o qual permite a parada da reação. E procedeu-se a coloração, utilizando 30 µL da amostra e 300 µL de verde malaquita com leitura da absorbância em 630 nm.

Para a determinação da atividade da ecto-5'-nucleotidase, preparou-se solução de incubação similar da NTPDase, substituindo o CaCl₂ 50 mM por cloreto de magnésio (MgCl₂) 100 mM e utilizou-se como substrato o AMP 20 mM, com leitura da absorbância em 630 nm.

Para ambas as determinações de hidrólise dos nucleotídeos utilizou-se as médias das absorbâncias multiplicadas pelo FC do fosfato, e divididas pelo tempo de incubação, volume e concentração de proteínas. Ao final os resultados foram expressos em nmol Pi/min/mg de proteína.

3.3.2.3. Atividade da ADA em linfócitos periféricos

Para avaliação da ADA pipetou-se na placa 30 µL de amostra e 90 µL de adenosina, também se identificou a cavidade denominada “branco da amostra”, na qual pipetou-se apenas a solução de adenosina, sendo a placa incubada por 60 minutos à 37°C, após esse período pipetou-se 30 µL da amostra no poço branco de cada amostra, e em ambos os poços colocou-se 80 µL de fenol/nitroprussiato e 80 µL de hipoclorito alcalino. A placa foi novamente incubada pelo período de 30 minutos à 37°C e procedida a leitura a 620 nm. O protocolo foi

realizado em triplicata e para definição dos resultados utilizou-se a média das absorvâncias e do padrão, multiplicados pelo FC, sendo os valores obtidos expressos em unidades/litro (U/L).

3.3.3. Avaliação do Perfil Oxidativo

O perfil oxidativo dos indivíduos em estudo foi avaliado pela determinação de indicadores de estresse oxidativo, como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), MPO e carbonilação de proteínas, e pela avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, concentrações de SOD, CAT, ácido ascórbico (vitamina C), tióis proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH). As leituras espectrofotométricas foram executadas em espectrofotômetro de microplacas Multiskan™ GO.

3.3.3.1. TBARS

A avaliação de TBARS foi realizada em quadriplicata pelo protocolo de Jentzsch *et al.* (1996), com leitura a 532 nm. Os resultados obtidos foram expressos em nmol MDA/mL. Resumidamente, 25 µL de amostra foram incubados com igual volume de água, acrescido de 5 µL de hidroxitolueno butilado (BHT) 10 mM, 295 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1%, 25 µL de lauril sulfato de sódio (SDS) 8,1% e 125 µL de TBA 0,6% a 95°C por 60 minutos, como padrão utilizou-se o malondialdeído (MDA) 0,03 mM.

Essa técnica tem como objetivo medir a formação de MDA, uma substância formada pela reação das ERO com os lipídios de membrana levando à lipoperoxidação (LPO). A LPO ocasiona alterações na membrana que compreendem transtornos de permeabilidade, perda de seletividade e comprometimento dos componentes da matriz extracelular. O MDA, quando aquecido em presença do ácido tiobarbitúrico, forma um composto de coloração rosa, o qual foi medido espectrofotometricamente (JENTZSCH *et al.*, 1996; OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

3.3.3.2. Mieloperoxidase (MPO)

A análise da MPO foi executada pelo método de Metcalf *et al.* (1986) com adaptações, com leitura a 492 nm, sendo os resultados expressos em mM de quinoneimina produzido em 30 minutos. Resumidamente, 12 µL de amostra foram incubados com 148 µL aminoantipirina 2,5 mM em solução fenólica e 170 µL de H₂O₂ 1,7 mM à 37°C por 30 minutos e depois procedida a leitura espectrofotométrica. A MPO é uma heme enzima produzida por mediadores inflamatórios e liberada dos leucócitos (linfócitos e neutrófilos) em locais de lesão. Esta enzima

catalisa a reação de íons de cloreto com peróxido de hidrogênio, gerando grandes quantidades de HOCl, que compreende uma ERO com alta capacidade reativa.

3.3.3.3. Carbonilação de proteínas

A carbonilação das proteínas sérica compreende o resultado da ação direta das EROs produzindo danos às biomoléculas por modificações oxidativas nas proteínas, sendo determinado pelo método de Levine *et al.* (1990) com modificações. Para o procedimento laboratorial procedeu-se inicialmente a dosagem de proteínas da amostra e sequencialmente, a partir de 500 µL de soro, as proteínas foram precipitadas utilizando 250 µL de TCA 10% e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, descartando o sobrenadante. Ao precipitado adicionou-se 250 µL de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM no tubo teste e 250 µL de ácido clorídrico (HCl) 2 M ao tubo controle da amostra, incubou-se à temperatura ambiente por 30 min. Durante a incubação, as amostras foram agitadas vigorosamente a cada 15 min. Após a incubação, 250 µL de TCA 10% foi adicionado ao precipitado de proteína e centrifugado a 5000 rpm por 5 min. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol/acetato de etila (1:1), centrifugando o sobrenadante para remover o DNPH livre. O precipitado foi dissolvido em 1,5 ml de tampão de desnaturação (SDS – 2% pH 8,0) e incubado a 37 °C por 10 min. A intensidade da cor do sobrenadante foi medida usando um espectrofotômetro a 370 nm, utilizando HCl 2 M como controle. O teor de carbonilação foi calculado usando o coeficiente de extinção molar e os resultados foram expressos como nmol por miligrama de proteína.

3.3.3.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

As enzimas SOD e CAT fazem parte do sistema de defesa antioxidante enzimático, promovendo a prevenção e controle de formação das EROs. A atividade da SOD no sangue total foi realizada de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972). Neste método, a SOD presente na amostra compete com o sistema de detecção do ânion superóxido, sendo que uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a taxa de oxidação da adrenalina. A oxidação da adrenalina promove a formação do adrenocromo, que é detectado por espectrofotômetro a 480 nm em meio reacional contendo glicina-hidróxido de sódio (50 mM, pH 10) e epinefrina (60 mM, pH 2). A atividade da SOD foi expressa em unidades/mg de proteína⁻¹.

A determinação da atividade de CAT foi realizada de acordo com um método modificado de Nelson e Kiesow (1972). Este ensaio envolve a mudança na absorvância em 240

nm devido à decomposição dependente de CAT do peróxido de hidrogênio. Uma alíquota (20 µL) de amostra de sangue total foi homogeneizada em 180 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a qual foi utilizada para realização da determinação espectrofotométrica, pela adição de 10 µL de peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. A alteração na absorbância a 240 nm foi medida durante 2 minutos. A atividade da CAT foi calculada usando o coeficiente de extinção molar e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.3.3.5. *Conteúdo de ácido ascórbico*

A análise do conteúdo de ácido ascórbico foi realizada com base no método de Jacques-Silva *et al.* (2001) com leitura de absorbância em 520 nm. O ácido ascórbico, também denominado vitamina C, possui função de antioxidante exógeno, transformando as ERO em formas inertes.

As amostras de soro foram analisadas em triplicata nas placas, pipetou-se 100 µL de amostra, 25 µL de água destilada, 25 µL de TCA 13,3% e 20 µL de DNPH, incubou-se as placas a 37°C por 120 minutos. Ao final da incubação, para parar a reação pipetou-se 130 µL de ácido sulfúrico 65%, e procedeu-se a leitura. Realizou-se o cálculo, multiplicando a média das absorbâncias pelo FC, e os resultados foram expressos em gramas/litro (g/L).

3.3.3.6. *Tióis proteicos (PSH) e não-proteicos (NPSH)*

A determinação dos PSH e NPSH foi executada conforme a metodologia de Ellman (1959). Esses compostos são componentes do sistema de defesa não-enzimático. Resumidamente, para o procedimento experimental, a amostra foi adicionada em 200-260 µL de tampão fosfato de potássio (TFK) 50 mM pH 6,8 e sequencialmente procedeu-se a adição de 15-20 µL de 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) 10 mM. O DTNB promove a redução dos tióis gerando um composto de coloração amarela, com leitura espectrofotométrica a 412 nm, sendo que o resultado foi expresso em µmol/mL de plasma.

3.3.4. **Parâmetros inflamatórios**

Para a determinação dos parâmetros inflamatórios avaliou-se citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNF-α; e a citocina anti-inflamatória IL-10 usando kits de imunoenensaio enzimático (ELISA) da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Estas análises foram realizadas em amostras de soro. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0, versão teste para acadêmicos. A normalidade foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e os *outliers* foram avaliados pelo Teste de Grubbs. A diferença entre as médias dos grupos foi analisada pelo teste T-Student não pareado, para dados paramétricos, onde H0 representou que a médias das diferenças são iguais a zero e H1 que a média das diferenças não são iguais a zero. As diferenças entre os grupos em relação às variáveis do estudo foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey, para dados paramétricos, para estas análises estatísticas considera-se como H0 que as variâncias das médias são assumidas como iguais e como H1 que há diferença entre as variâncias das médias. A definição do teste estatístico, teste T-Student ou ANOVA foi determinada pelo número de variáveis a serem analisadas. A correlação de variáveis foi procedida pelo teste de correlação de Pearson, e sequencialmente aplicou-se a análise de regressão linear dos dados que apresentaram correlação positiva (+1) ou negativa (-1), para tal considerou-se valores de r entre: $0 < 0,1$ correlação nula; $0,1 < 0,3$ correlação fraca; $0,3 < 0,6$ correlação moderada; $0,6 < 0,9$ correlação forte e; $0,9 < 1$ correlação muito forte. Os resultados dos parâmetros analisados foram expressos de forma gráfica e apresentados como média e desvio padrão. Considerou-se estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese nula foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PERFIL DOS PACIENTES COM CCP

4.1.1. Resultados

4.1.1.1. Características clínicas

As características dos participantes da pesquisa foram obtidas por meio de formulário de pesquisa em entrevista presencial, sendo que informações complementares e adicionais foram obtidas pela análise dos prontuários dos pacientes com CCP. As características clínicas dos pacientes estão representadas na Tabela 1, sendo características gerais apresentadas na Tabela 2.

Dados não mostrados nas tabelas incluem a variação da faixa etária dos grupos de estudo, onde tem-se indivíduos com 40 a 80 anos e 45 a 84 anos nos grupos controle e CCP, respectivamente. A maioria dos indivíduos com CCP (78,1%) encontra-se aposentado, porém ressalta-se que as atividades laborais mais frequentes desenvolvidas por esse grupo incluíram: agricultor, motorista, pedreiro, carpinteiro, doméstica, borracheiro e trabalhadores da indústria. O grupo de pacientes com CCP relatou como sintomas mais frequentes a dor persistente, má deglutição e dificuldade para engolir, indisposição, tosse e perda da voz. Neste grupo indica-se também a presença de comorbidades sendo relatado com maior frequência hipertensão e diabetes.

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes com CCP e grupo controle

	Grupo Controle (n: 33)	Grupo CCP (n: 32)
Idade	61,2 ± 9,4	61,4 ± 9,1
Sexo		
Masculino	84,8% (n: 28)	87,5% (n: 28)
Feminino	15,2% (n: 05)	12,5% (n: 04)
Localização do Tumor		
Cavidade Oral	-	50% (n: 16)
<i>Masculino</i>	-	81,3% (n: 13)
<i>Feminino</i>	-	18,7% (n: 3)
Laringe	-	31,3% (n: 10)
<i>Masculino</i>	-	100% (n: 10)
<i>Feminino</i>	-	0% (n: 0)
Faringe	-	12,5% (n: 04)
<i>Masculino</i>	-	100% (n: 10)
<i>Feminino</i>	-	0% (n: 0)
Demais sítios	-	6,2% (n: 02)

<i>Masculino</i>	-	50% (n: 01)
<i>Feminino</i>	-	50% (n: 01)
Tempo de diagnóstico		
0-02 anos	-	75% (n: 24)
02-04 anos	-	12,5% (n: 04)
>04 anos	-	12,5% (n: 04)
Metástases/Recidivas		
Sim	-	12,5% (n: 04)
Não	-	87,5% (n: 28)
Tratamento		
Sim	-	81,3% (n: 26)
Não	-	18,7% (n: 06)

Fonte: A autora (2022).

Legenda: Os dados clínicos foram obtidos através de formulário de pesquisa e avaliação dos prontuários dos pacientes com CCP.

Tabela 2 – Características gerais dos pacientes com CCP e grupo controle

	Grupo Controle (n: 33)	Grupo CCP (n: 32)
Atividade Laboral		
Ativo	54,5% (n: 18)	21,9% (n: 07)
Aposentado	45,5% (n: 15)	78,1% (n: 25)
Grupo familiar		
01-02 pessoas	54,5% (n: 18)	59,4% (n: 19)
03-05 pessoas	42,4% (n: 14)	34,4% (n: 11)
>06 pessoas	3,0% (n: 01)	6,2% (n: 02)
Escolaridade		
Fundamental incompleto	36,4% (n: 12)	84,4% (n: 27)
Fundamental completo	3,0% (n: 01)	0% (n: 0)
Médio incompleto	6,1% (n: 02)	9,4% (n: 3)
Médio completo	27,3% (n: 09)	6,2% (n: 02)
Superior incompleto	0% (n: 0)	0% (n: 0)
Superior completo	27,3% (n: 09)	0% (n: 0)
Cigarro, tempo de tabagismo*		
Sim, mais de 10 anos	0% (n: 0)	71,9% (n: 23)
Sim, menos de 10 anos	9,1% (n: 03)	3,1% (n: 01)
Não	90,9% (n: 30)	25% (n: 08)
Consumo bebidas alcoólicas		
Sim, frequente (>3x na semana)	0% (n: 0)	25% (n: 08)
Sim, esporádico (<3x na semana)	45,5% (n: 15)	9,4% (n: 03)
Não	54,5% (n: 18)	65,6% (n: 21)
Prática de exercícios físicos		
Sim	57,6% (n: 19)	34,4% (n: 11)
Não	42,4% (n: 14)	65,6% (n: 21)

Fonte: A autora (2022).

Legenda: As características gerais dos pacientes CCP e grupo controle foram obtidas através de formulário de pesquisa. *A variável *cigarro* consiste no hábito de fumar, incluindo fumantes e ex-fumantes.

4.1.2. Discussão

Os dados avaliados no estudo indicaram uma prevalência de tumores na região da cabeça e pescoço em indivíduos do sexo masculino (87,5%), com idade mais avançada, sendo a média de idade do grupo CCP de $61,4 \pm 9,1$ anos e o percentual de indivíduos com mais de 60 anos de 59,8% (n: 19), com predominância de tumores na cavidade oral seguido da laringe (50% e 31,3%, respectivamente), sendo que estes dados corroboram com a literatura (GALBIATTI *et al.*, 2013; BRASIL, 2017; ALFOUZAN, 2019).

A maioria dos pacientes apresentava um diagnóstico recente dos tumores (75% a menos de 02 anos), sendo que 81,3% (n: 26) já havia sido submetido a excisão cirúrgica/tratamento do tumor, e em muitos casos observou-se que o procedimento cirúrgico foi debilitante, comprometendo aspectos relacionados a voz, deglutição e aparência. Não foi observada correlação entre o histórico familiar de câncer com a incidência dos tumores, representando assim a etiologia multifatorial para incidência de CCP, onde fatores ambientais são cruciais para o desenvolvimento dos tumores (ALFOUZAN, 2019).

Outro aspecto importante observado neste estudo, corrobora com o principal fator de risco para o desenvolvimento de CCP indicado na literatura que se refere ao hábito de fumar, sendo que 75% dos pacientes eram fumantes, dos quais 71,9% relatou ter o hábito de tabagismo por mais de 10 anos. O hábito de ingerir bebidas alcoólicas é um potencializador da incidência de CCP, porém o grupo em estudo relatou baixa ingestão de bebidas alcoólicas (34,4% indicou consumo esporádico ou frequente) (NIH, 2019; SBCCP, 2018).

Indica-se que os indivíduos com CCP também apresentavam baixa escolaridade onde 84,4% não completou o ensino fundamental, além de apresentarem histórico de atividade laboral em profissões de baixo rendimento socioeconômico e elevada exposição a agentes carcinogênicos, como a radiação ultravioleta e compostos químicos utilizados na produção agrícola (GALBIATTI *et al.*, 2013). Este resultado é similar ao estudo realizado por Castro e colaboradores (2019), que indicaram que o CCP era mais frequente em indivíduos de baixa renda em uma cidade do sul do Brasil, e que apresentavam atividades ocupacionais relacionadas ao comércio, construção e limpeza, manutenção de residências, hotéis e edifícios.

Nosso estudo indicou a presença expressiva de indivíduos com hábito do tabagismo, ressalta-se que fumar promove o desequilíbrio redox e causa um quadro acentuado de estresse oxidativo. O tabagismo apresenta-se associado a inúmeras alterações celulares e metabólicas, incluindo alteração na função endotelial, promoção de inflamação, promove metilação e danos oxidativos ao DNA, além de peroxidação lipídica, danos às células de macro e micromoléculas e distúrbios nos sistemas de defesa antioxidantes, além de atuar alterando o pH dos fluidos

corporais e conseqüentemente, a estabilização dos radicais livres, sendo crucial no processo de iniciação da carcinogênese. A fumaça do cigarro promove o aumento da taxa de dano oxidativo em 30-50%, induzindo morte celular (CHEN *et al.*, 2018; JOHNSON *et al.*, 2021).

O tabagismo também promove a expressão de receptores alfa-7 nicotínicos de acetilcolina promovendo proliferação e migração de células cancerígenas. A nicotina presente no cigarro regula positivamente a expressão de proteínas mesenquimais enquanto regula negativamente as proteínas epiteliais, apoiando assim a motilidade celular e a invasão através da indução da transição epitelial-mesenquimal, esse podendo também reduzir a eficácia de medicamentos anticancerígenos pela atuação no metabolismo mediado pelo citocromo P450. Ressalta-se também, que o tabaco promove a manutenção do TME com características pró-inflamatórias e grandes quantidade de EROs. Desta forma, indica-se que a manutenção do hábito de tabagismo constitui um fator de pior prognóstico aos pacientes com CCP, pois apresenta-se intrinsecamente associado com a promoção, progressão tumoral e estímulo a metástases tumorais (MIRANDA-GALVIS *et al.*, 2021).

O estudo de Domingo-Vidal e colaboradores (2019) indicou que a fumaça do cigarro promoveu *in vitro* a indução de estresse oxidativo, fluxo glicolítico, expressão do transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) e senescência em fibroblastos associados ao câncer (CAFs), demonstrando assim como esse componente é capaz de modular o metabolismo e promover agressividade em CCP; o estudo também indicou que compostos antioxidantes demonstraram potencial de diminuir esses danos.

Esses dados apresentados indicam o perfil dos pacientes com CCP, a partir dos quais é possível compreender as características desse grupo populacional e indicar que possíveis estratégias de prevenção devem apresentar como foco indivíduos de baixa renda com baixa escolaridade, indicando, principalmente, os malefícios associados ao tabagismo e sua associação com os CCP.

4.2. CAPÍTULO 01 – ARTIGO 01

Desregulação da atividade das ectoenzimas purinérgicas em câncer de cabeça e pescoço promove imunossupressão

Revista: *Molecular Biology Reports*.

Data da publicação: 01 de junho de 2022.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07586-9>

Comprovante publicação:

Molecular Biology Reports
<https://doi.org/10.1007/s11033-022-07586-9>

ORIGINAL ARTICLE



Deregulation of purinergic ectoenzyme activity in head and neck cancer promotes immunosuppression

Filomena Marafon¹ · Beatriz da Silva Rosa Bonadiman¹ · Sabine de Rocco Donassolo² · Katiuska Marins³ · Mariane Magalhães Zanchi³ · Greicy Cristine Kosvosky² · Helena Fornari Basso² · Ariane Zamoner^{1,3} · Margarete Dulce Bagatini^{1,2,4} 

Received: 14 March 2022 / Accepted: 9 May 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

RESULTADOS

Características clínicas

Avaliamos as características clínicas dos grupos por meio de entrevista com cada participante e análise de prontuários ambulatoriais.

As médias de idade foram semelhantes entre os grupos controle e CCP ($61,4 \pm 9,1$ e $61,2 \pm 9,4$ anos, respectivamente). Houve maior incidência de CCP em homens (87,5%) do que em mulheres (12,5%), e os sítios tumorais primários foram a cavidade oral (50%) e a laringe (31,3%). Os pacientes tinham diagnóstico há menos de 2 anos e 81,3% foram submetidos à remoção cirúrgica e tratamento medicamentoso.

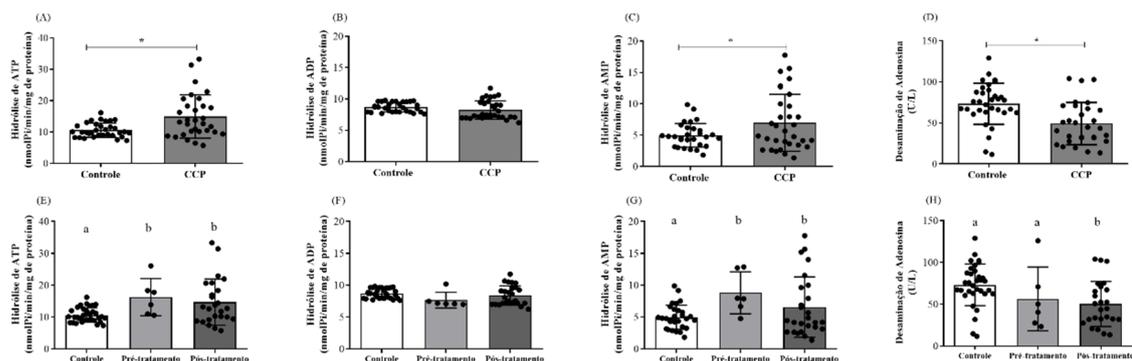
Os pacientes com CCP apresentaram menor nível socioeconômico e menor escolaridade, com 84,4% não completando o ensino fundamental. O tabagismo foi o principal fator de risco para o desenvolvimento de CCP (75%).

Alterações da atividade das ectoenzimas purinérgicas

A avaliação das enzimas purinérgicas no CCP indicou maiores níveis de hidrólise de ATP e AMP ($p < 0,05$) nos pacientes com CCP do que nos controles. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos quanto à hidrólise do ADP. A atividade de ADA em linfócitos foi significativamente menor ($p < 0,05$) em pacientes com CCP do que em controles (Fig. 6A-D).

Em seguida, medimos a atividade das ectoenzimas purinérgicas, comparando os indivíduos submetidos à excisão cirúrgica do tumor ($n = 26$) com aqueles com tumores ativos ($n = 6$). Os resultados foram idênticos aos observados sem a inclusão da variável “tratamento” (Fig. 6E-H). A atividade da E-NTPDase significativamente maior com o substrato ATP foi observada em pacientes com CCP pré-tratamento e pós-tratamento ($p < 0,05$). Em relação ao substrato ADP, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Para a ecto-5'-nucleotidase, foi observada atividade significativamente maior no grupo CCP antes e após o tratamento do que no grupo controle ($p < 0,05$), sugerindo uma transformação mais significativa de AMP em Ado; e observada a atividade da ADA significativamente menor, sugerindo diminuição da desaminação de Ado em inosina no grupo CCP pós-tratamento ($p < 0,05$). Esses dados sugerem acúmulo de Ado no meio extracelular, mesmo após a remoção dos tumores.

Figura 6 – Atividade das ectoenzimas purinérgicas E-NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA em amostras de linfócitos em pacientes com CCP e indivíduos controles saudáveis, e CCP pré e pós-tratamento



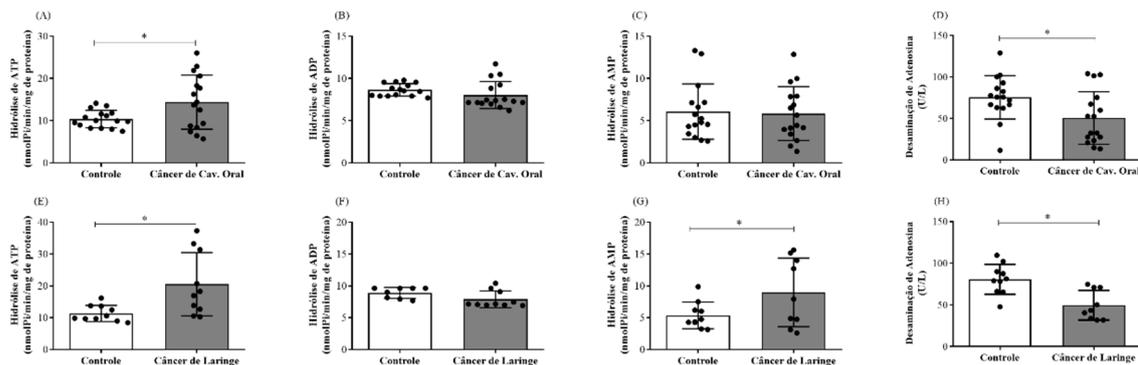
Fonte: A autora (2022).

Legenda: (A, E) Hidrólise de ATP, (B, F) Hidrólise de ADP, (C, G) Hidrólise de AMP. (D, H) Desaminação de Ado. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A amostra foi composta por 32 pacientes com CCP (pré e pós-tratamento, $n = 6$ e 26 , respectivamente) e 33 indivíduos saudáveis no grupo controle (A, B, C e D: teste T-Student não pareado, $*p < 0,05$; E, F, G e H: ANOVA de uma via, com Tukey como teste post hoc, letras diferentes indicam $p < 0,05$).

O grupo CCP foi categorizado de acordo com os tumores mais frequentes e avaliamos a atividade das ectoenzimas purinérgicas no câncer de cavidade oral e laringe (Fig. 7A-D e 7E-

H, respectivamente). A hidrólise de ATP foi significativamente maior nos grupos ($p < 0,05$). A hidrólise de AMP ($p < 0,05$) em linfócitos foi significativamente maior em pacientes com câncer de laringe do que no grupo controle. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos quanto à hidrólise do ADP. Tanto no grupo de câncer de cavidade oral quanto de laringe, a atividade da ADA foi significativamente menor do que no grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 7 – Atividade das ectoenzimas purinérgicas E-NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA em amostras de linfócitos em pacientes com câncer de cavidade oral e câncer de laringe



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Atividade das ectoenzimas purinérgicas em pacientes com câncer de cavidade oral (A-D), câncer de laringe (E-H) e controles saudáveis. (A, E) Hidrólise de ATP, (B, F) Hidrólise de ADP, (C, G) Hidrólise de AMP e (D, H) Desaminação de Ado. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. A amostra foi composta por 16 pacientes com câncer de cavidade oral, dez pacientes com câncer de laringe e respectivos grupos controle (Teste T-Student não pareado, $*p < 0,05$).

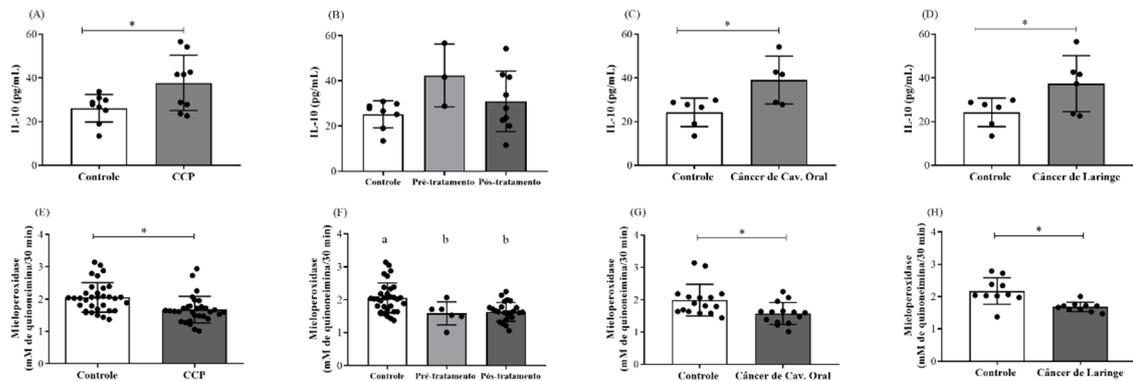
Esses resultados sugerem um acúmulo de grandes concentrações extracelulares de Ado em pacientes com CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe, possivelmente promovendo imunossupressão e efeitos pró-tumorais, mesmo após a remoção do tumor. No entanto, apesar dos avanços metodológicos, a avaliação dos níveis extracelulares de Ado no microambiente tumoral (TME) continua sendo um desafio devido à flutuação das concentrações e à meia-vida curta desse metabólito; portanto, medimos IL-10 e MPO como marcadores de imunossupressão e indicadores indiretos dos níveis aumentados de Ado extracelular [28].

Concentrações de interleucinas e MPO

A Figura 8A-D exibe os níveis de IL-10 em amostras de pacientes com CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe, além de avaliar CCP pré e pós-tratamento. Níveis significativamente mais elevados foram observados nos grupos com câncer em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não houve alterações na IL-10 em relação ao tratamento ($p > 0,05$). A Fig. 8E-H exibe a atividade de MPO em amostras de pacientes com câncer, e CCP pré e pós-tratamento. Níveis significativamente diminuídos desse marcador foram observados em todos

os casos ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem a promoção de um TME anti-inflamatório e imunossupressor.

Figura 8 – Concentração de IL-10 e mieloperoxidase

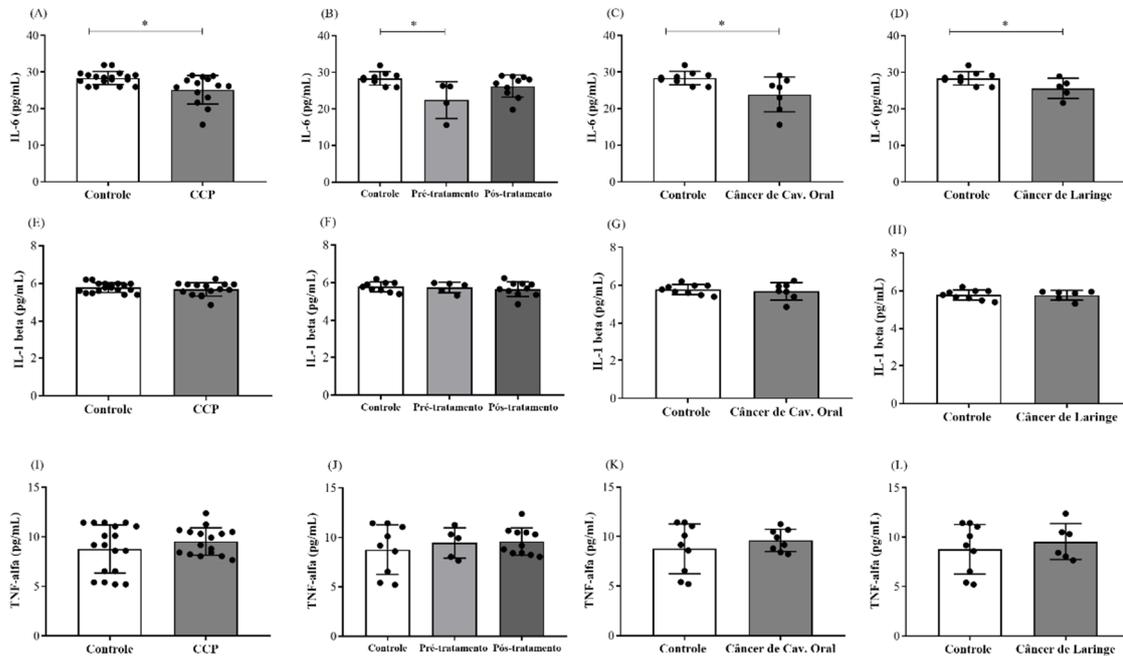


Fonte: A autora (2022).

Legenda: Níveis de interleucina 10 (IL-10, A-D) e mieloperoxidase (MPO, E-H) em amostras de soro. IL-10: (A) Pacientes com CCP ($n = 9$) e controles saudáveis ($n = 9$); (B) pacientes CCP pré e pós-tratamento ($n = 3$ e 9 , respectivamente) e controles saudáveis ($n = 8$). (C) Pacientes com câncer de cavidade oral ($n = 5$) e controles saudáveis ($n = 6$). (D) Pacientes com câncer de laringe ($n = 6$) e controles saudáveis ($n = 6$). MPO: (E) Pacientes com CCP ($n = 32$) e controles saudáveis ($n = 33$), (F) pacientes com CCP pré e pós-tratamento ($n = 6$ e 26 , respectivamente) e controles saudáveis ($n = 33$). (G) Pacientes com câncer de cavidade oral ($n = 16$) e controles saudáveis ($n = 16$). (H) Pacientes com câncer de laringe ($n = 10$) e controles saudáveis ($n = 10$). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. (a, c, d, e, g e h: teste *T-Student* não pareado, $*p < 0,05$; b e f: ANOVA de uma via, com Tukey como teste *post hoc*, letras diferentes indicam $p < 0,05$).

Em relação às interleucinas pró-inflamatórias, os níveis de IL-6 estão representados na Figura 9A-D, demonstrando níveis diminuídos em pacientes com câncer e no grupo CCP antes do tratamento ($p < 0,05$). Os níveis de IL-1 β e TNF- α não mostraram diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Fig. 9E-H e 9I-L, respectivamente).

Figura 9 – Concentração de interleucinas pró-inflamatórias: IL-6, IL-1 β e TNF- α



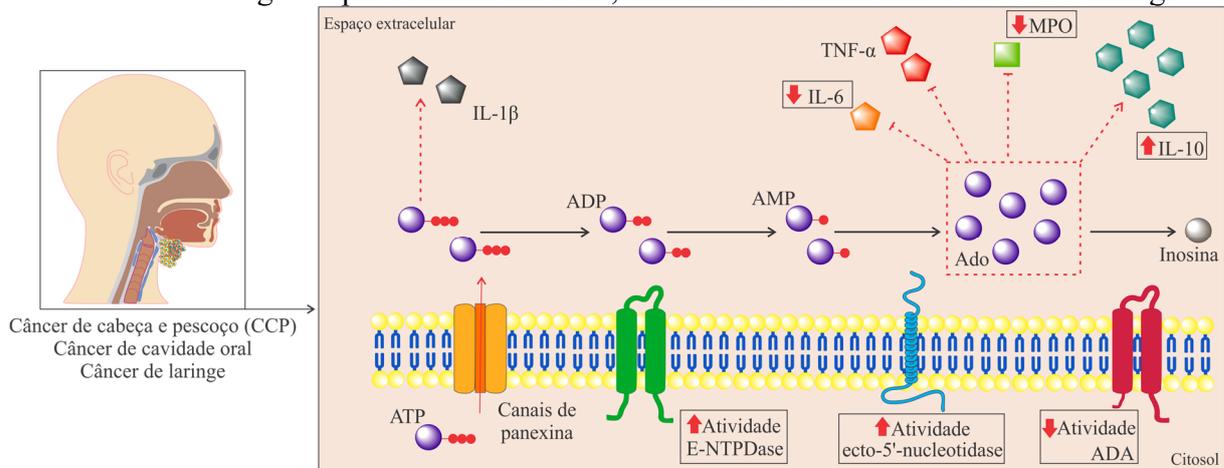
Fonte: A autora (2022).

Legenda: Níveis de interleucina: IL-6 (A-D), IL-1 β (E-H) e TNF- α (I-L) em amostras de soro. (A, E, I) Pacientes com CCP (n = 16) e controles saudáveis (n = 18). (B, F, J) Pacientes CCP pré e pós-tratamento (n = 5 e 11, respectivamente) e controles saudáveis (n = 9). (C, G, K) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 8) e controles saudáveis (n = 9). (D, H, L) Pacientes com câncer de laringe (n = 6) e controles saudáveis (n = 9). O protocolo laboratorial para a realização das análises está descrito na seção de métodos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. (A, C, D, E, G, H, I, K e L: Teste *t-Student* não pareado, * $p < 0,05$; B, F e J: ANOVA uma via, com Tukey como teste *post hoc*, * $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Nosso estudo indicou uma importante correlação entre a desregulação do metabolismo de sinalização purinérgica e vários tumores. Essa via de sinalização atua poderosamente no CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe e está associada a prognósticos e resultados desfavoráveis (Fig. 10 representa o resumo gráfico deste estudo).

Figura 10 – Correlação entre a desregulação na atividade das ectoenzimas purinérgicas e os efeitos imunológicos que ocorrem em CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe



Fonte: A autora (2022).

Legenda: A correlação das ectoenzimas indica que há aumento da E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase e diminuição da atividade da adenosina desaminase (ADA), com aumento da hidrólise de ATP e AMP e diminuição da desaminação de adenosina em inosina. Esses achados sugerem um acúmulo de adenosina no meio extracelular. A adenosina extracelular promove níveis aumentados de IL-10, supressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α e IFN- α) e diminuição dos níveis de mieloperoxidase (MPO). Esses efeitos, promovidos pelo aumento dos níveis de Ado, têm efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, favorecendo a progressão tumoral, metástase e recorrência.

Nossos achados sobre a idade, sexo, localização do tumor e presença de fatores de risco, incluindo tabagismo, corroboram os de relatos anteriores (ALFOUZAN, 2019). O tabagismo e os indicadores de baixo nível socioeconômico (baixa escolaridade) em CCP encontrados neste estudo são fatores epidemiológicos relevantes para a compreensão desses pacientes.

Compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento desses tumores, incluindo os mecanismos de sinalização purinérgica e mecanismos imunológicos são fundamentais para o melhor entendimento da fisiopatologia desse grupo de tumores. Nossos achados podem levar a propostas de estratégias terapêuticas e manejo clínico adequado.

A desregulação no metabolismo e atividade das ectoenzimas purinérgicas no CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe representam modificações do TME, progressão tumoral, proliferação celular desordenada, angiogênese, desregulação da apoptose, metástases e recorrências. Esta fisiopatologia tem sido descrita em outros tumores, como melanoma cutâneo, câncer de pulmão, câncer de mama e câncer de colo uterino (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015; PFAFFENZELLER; FRANCIOSI; CARDOSO, 2020).

Ressalta-se que o CCP, conforme indicado por Theodoraki *et al.*, compreende um grupo de carcinomas com características fortemente imunossupressoras. Pacientes com estágios mais avançados da doença, metástases e recorrências, apresentam defeitos imunológicos sistêmicos,

com alto grau de supressão imunológica correlacionado com mau prognóstico (THEODORAKI *et al.*, 2018; WHITESIDE, 2018). Por esse motivo, é essencial identificar os mecanismos associados ao desenvolvimento desse ambiente imunossupressor para projetar tratamentos e manejos adequados.

Observamos atividade aumentada da E-NTPDase no substrato ATP nos tumores avaliados, sugerindo hidrólise mais significativa do ATP extracelular. O ATP extracelular atua como um padrão molecular associado ao dano que guia as células fagocitárias para o local da inflamação e alerta o sistema imunológico. O ATP também é essencial para ativar o inflamassoma e a subsequente liberação de IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias (ALLARD; CHROBAK; STAGG, 2016; BOISON; YEGUTKIN, 2019). Normalmente, o ATP é degradado e promove o acúmulo de altos níveis de Ado no TME (PFAFFENZELLER; FRANCIOSI; CARDOSO, 2020; VIGANO *et al.*, 2019).

O achado mais importante deste estudo é o aumento da atividade da ecto-5'-nucleotidase em CCP e câncer de laringe, sugerindo aumento da hidrólise de AMP a Ado; e verificou-se diminuição da atividade de ADA em CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe. Esses achados sugerem diminuição da desaminação do Ado para inosina e aumento dos níveis de Ado extracelular, uma potente molécula imunossupressora (BAGATINI *et al.*, 2018a).

Zanini *et al.* estudaram pacientes com câncer de pulmão em estágio IV e encontraram alta hidrólise de ATP e atividade diminuída de ADA, sugerindo que a sinalização purinérgica pode participar da progressão tumoral (ZANINI *et al.*, 2019). Theodoraki *et al.* propuseram os mecanismos de evasão imunológica do CCP e sugeriram que o acúmulo de Ado constitui um desses mecanismos com alta importância biológica (THEODORAKI *et al.*, 2018). Ludwig *et al.* demonstraram níveis elevados de adenosina em exossomos isolados do plasma de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, indicando que os níveis de Ado na circulação refletem a progressão da doença (LUDWIG *et al.*, 2020). Seus dados corroboraram nossos achados, demonstrando a importância da via da ectoenzima purinérgica na formação e acúmulo da Ado, o que leva a piores desfechos no CCP.

A alta atividade e expressão de CD73 em células cancerosas têm sido associadas a baixa sobrevida global, presença de metástases e recorrência em diversos tumores (ALLARD *et al.*, 2019; ARAB; HADJATI, 2019; DE LEVE; WIRSDÖRFER; JENDROSSEK, 2019). Esses dados sugerem que os achados do nosso estudo, ou seja, o aumento da atividade dessa ectoenzima, representam um fator essencial associado às recidivas tumorais, mesmo após a remoção cirúrgica.

O acúmulo de Ado é um mecanismo crítico para a evasão imunológica. Adenosina promove estímulo a angiogênese em tumores sólidos hipóxicos, resultando na proliferação de células endoteliais humanas, expressão de fator de crescimento endotelial vascular, metástase, desregulação da apoptose, estimulação de células imunossupressoras, como células T reguladoras e células derivadas de mieloides, supressão de células apresentadoras de antígenos e promoção da sobrevivência em células cancerosas (ALLARD *et al.*, 2019; ARAB; HADJATI, 2019; BOISON; YEGUTKIN, 2019; DE LEVE; WIRSDÖRFER; JENDROSSEK, 2019; JADIDI-NIARAGH, 2019; LEONE; EMENS, 2018). A adenosina diminui a função das células T antitumorais inibindo uma série de respostas das células T. Esta molécula pode suprimir a função de células NK e células NK ativadas por linfocinas, levando à falha de uma resposta imune antitumoral eficaz (ARAB; HADJATI, 2019).

O Ado extracelular atua nos receptores do tipo A2a e A2b, promovendo a ativação das células imunes. A ativação desses receptores limita a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, conforme observado neste estudo. Níveis aumentados desse nucleosídeo extracelular também podem estar relacionados ao desenvolvimento de resistência a drogas e um curso mais agressivo de tumores ativos (BOISON; YEGUTKIN, 2019; VIGANO *et al.*, 2019).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e imunossupressora (CONTI *et al.*, 2003). O aumento de IL-10 em células tumorais está associado à modulação do TME, promovendo proliferação, metástase e escape imune do tumor (SARAIVA *et al.*, 2020). Zhao *et al.*, em uma meta-análise, verificou o impacto da IL-10 no desfecho de diversos tumores, indicando que níveis séricos elevados de IL-10 se correlacionam-se com prognóstico ruim e baixa sobrevida, sugerindo que este seja um biomarcador promissor na avaliação da progressão tumoral e tempo de sobrevida em tumores sólidos e hematológicos (ZHAO *et al.*, 2015). Torres-Pineda *et al.* relataram que as células do câncer de colo uterino produzem altas concentrações de Ado e níveis aumentados de IL-10, promovendo evasão imune e progressão tumoral (TORRES-PINEDA *et al.*, 2020).

A diminuição da atividade da MPO também é utilizada como um marcador indireto de imunossupressão. A MPO é produzida principalmente por neutrófilos, e a Ado possui efeito inibitório sobre essas células sanguíneas, diminuindo conseqüentemente a secreção de MPO (BOISON; YEGUTKIN, 2019; NDREPEPA, 2019; VIGANO *et al.*, 2019). A MPO produzida pelos neutrófilos tem potencial atividade tumoricida; inversamente, diminuições em sua atividade estão associadas à progressão do tumor. A presença de neutrófilos saudáveis no TME, secretando substâncias tóxicas como MPO, pode prevenir metástases. Em modelo animal, a

administração de neutrófilos saudáveis reduziu o crescimento tumoral e prolongou a sobrevivência do animal, o que também foi observado em células de câncer de mama nos pulmões de camundongos (JAGANJAC *et al.*, 2010). Esses achados sugerem a importância crítica da MPO para a imunossupressão no câncer.

Os mecanismos imunossupressores promovidos pela via purinérgica sugerem que a modulação do sistema purinérgico tem potencial utilização terapêutica contra o câncer (VIJAYAN *et al.*, 2017). Atualmente, o direcionamento das vias E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase tem sido utilizado como estratégia em diversos tumores, já com alguns medicamentos em ensaios clínicos, principalmente inibidores de moléculas direcionadas a ectoenzimas, compostos estes que promovem a manipulação direcional de ATP no TME e compostos direcionados ao metabolismo intracelular de Ado (ALLARD *et al.*, 2019; ALLARD; CHROBAK; STAGG, 2016; DE LEVE; WIRSDÖRFER; JENDROSSEK, 2019; LEONE; EMENS, 2018; SEK *et al.*, 2018).

Níveis elevados de Ado em tumores são essenciais para a manutenção de um ambiente imunossupressor crônico mediado por efeitos pró-tumorais, causando a progressão dos tumores e recorrências. A via de sinalização purinérgica que promove a quebra sequencial de nucleotídeos em Ado e inosina no ambiente tumoral, especialmente o papel da ecto-5'-nucleotidase, indica que o direcionamento dessa via pela inibição direta da atividade dessa ectoenzima tem aplicações farmacológicas convincentes contra esses tumores. Se fosse possível diminuir os níveis extracelulares de Ado, seria possível reduzir a imunossupressão inibindo os efeitos desta molécula, conseqüentemente diminuindo as recorrências e gerando melhores resultados (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

CONCLUSÃO

As ectoenzimas promovem o acúmulo extracelular de Ado, uma potente molécula imunossupressora que ajuda a manter um microambiente imunossupressor. Este efeito pode influenciar as metástases, a progressão e recorrência tumoral. Desta forma, a inibição da ecto-5'-nucleotidase pode servir como estratégia farmacológica para o tratamento imuno-oncológico desses tumores. Essa correlação aponta o caminho para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o manejo de pacientes com CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe durante o tratamento e após a remoção do tumor.

4.3. CAPÍTULO 02 – MANUSCRITO 02

Diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) e dano oxidativo crônico em câncer de cabeça e pescoço

RESULTADOS

Características clínicas

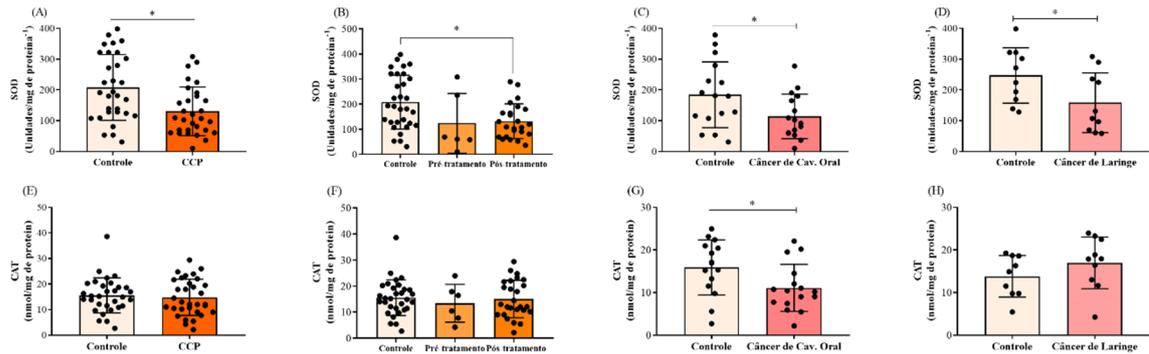
As características clínicas dos grupos desse estudo foram determinadas por meio de entrevista com cada participante e análise de prontuários ambulatoriais.

O grupo de indivíduos controle e com CCP apresentaram média de idade similares, sendo $61,4 \pm 9,1$ e $61,2 \pm 9,4$ anos, respectivamente. CCP apresentou maior incidência em homens (87,5%) do que em mulheres (12,5%) e os principais locais de localização dos tumores corresponderam à cavidade oral (50%) e laringe (31,3%). Os pacientes tinham diagnóstico há menos de 2 anos e 81,3% foram submetidos à remoção cirúrgica e tratamento medicamentoso. O tabagismo, principal fator de risco para o desenvolvimento de CCP foi relatado em 75% dos casos, sendo que o etilismo esteve presente em 34,4%. Os dados de tabagismo e etilismo foram autodeclarados pelos pacientes.

Atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A figura 11A-H mostra a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em amostras de pacientes com CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe, além de avaliar CCP pré e pós-tratamento. Níveis significativamente diminuídos da SOD foram observados em todos os grupos avaliados ($p < 0,05$; Fig. 11A-D). Referente à CAT, observou-se uma diminuição significativa da atividade dessa enzima nos pacientes com câncer de cavidade oral ($p < 0,05$; Fig. 11E), sendo que nos demais grupos não houve alterações ($p > 0,05$; Fig. 11F-H). Esses resultados indicam que os pacientes com CCP apresentam um déficit em suas defesas antioxidantes enzimáticas endógenas.

Figura 11 – Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)



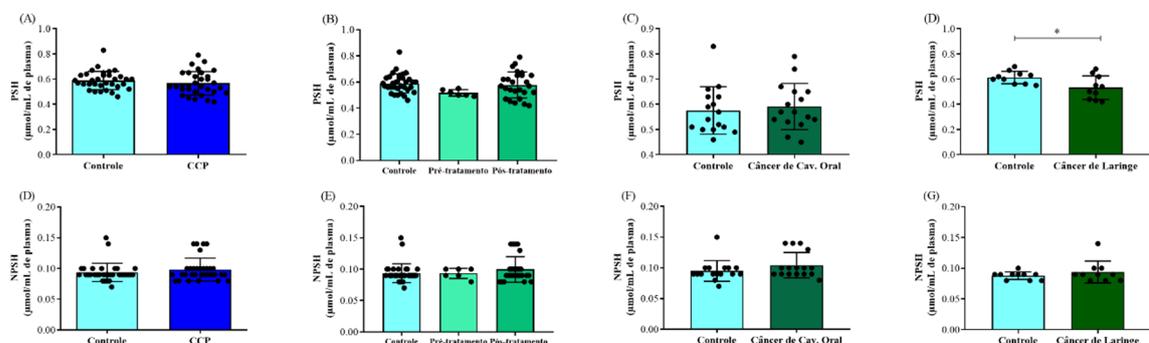
Fonte: A autora (2022).

Legenda: Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, A-D) e catalase (CAT, E-H) em amostras de sangue total. SOD: (A) Pacientes com CCP (n = 30) e controles saudáveis (n = 31); (B) pacientes CCP pré e pós-tratamento (n = 6 e 24, respectivamente) e controles saudáveis (n = 31). (C) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 16) e controles saudáveis (n = 16). (D) Pacientes com câncer de laringe (n = 10) e controles saudáveis (n = 10). CAT: (E) Pacientes com CCP (n = 32) e controles saudáveis (n = 31), (F) Pacientes com CCP pré e pós-tratamento (n = 6 e 26, respectivamente) e controles saudáveis (n = 31). (G) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 16) e controles saudáveis (n = 15). (H) Pacientes com câncer de laringe (n = 10) e controles saudáveis (n = 9). O protocolo laboratorial para a realização das análises está descrito na seção de métodos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. (A, C, D, E, G e H: teste T-Student não pareado, *p < 0,05; B e F: ANOVA one-way, com Tukey como teste post hoc, *p < 0,05).

Tióis proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH)

A avaliação dos grupamentos PSH e NPSH em amostras de pacientes com CCP, pré e pós-tratamento, câncer de cavidade oral e câncer de laringe indicaram apenas uma redução do grupo PSH em pacientes com câncer de laringe ($p < 0,05$) (Fig. 12D). Nos demais grupos não houve alterações ($p > 0,05$), conforme mostrado na figura 12A-C, E-H; indicando que as defesas antioxidantes não enzimáticas endógenas permanecem funcionais na maioria dos pacientes com CCP, porém apresentam um déficit em indivíduos com tumores de laringe.

Figura 12 – Concentração de tióis proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH)



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Concentração de tióis proteicos (PSH, A-D) e não proteicos (NPSH, E-H) em amostras de plasma. PSH: (A) Pacientes com CCP (n = 32) e controles saudáveis (n = 33); (B) pacientes CCP pré e pós-tratamento (n = 6 e 26, respectivamente) e controles saudáveis (n = 33). (C) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 16) e controles saudáveis (n = 16). (D) Pacientes com câncer de laringe (n = 10) e controles saudáveis (n = 10). NPSH:

(E) Pacientes com CCP (n = 32) e controles saudáveis (n = 33); (F) pacientes CCP pré e pós-tratamento (n = 6 e 26, respectivamente) e controles saudáveis (n = 33). (G) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 16) e controles saudáveis (n = 16). (H) Pacientes com câncer de laringe (n = 10) e controles saudáveis (n = 10). O protocolo laboratorial para a realização das análises está descrito na seção de métodos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. (A, C, D, E, G e H: teste T-Student não pareado, * $p < 0,05$; B e F: ANOVA one-way, com Tukey como teste post hoc.

Conteúdo de ácido ascórbico

A análise do conteúdo de ácido ascórbico, Fig. 13A-D, não indicou alterações desse marcador em nenhum dos grupos em estudo ($p > 0,05$), indicando que o conteúdo deste antioxidante exógeno não é afetado pela condição saúde-doença do paciente.

Carbonilação de proteínas

A figura 14A-D mostra os valores de carbonilação de proteínas, indicando níveis significativamente elevados em CCP e em pacientes com câncer de cavidade oral ($p < 0,05$; Fig. 14A e C). Não se observou alterações avaliando-se a variável tratamento e pacientes com câncer de laringe ($p > 0,05$; Fig. 14B e D). Esses resultados indicam a presença de dano oxidativo as proteínas em tumores de cabeça e pescoço e cavidade oral.

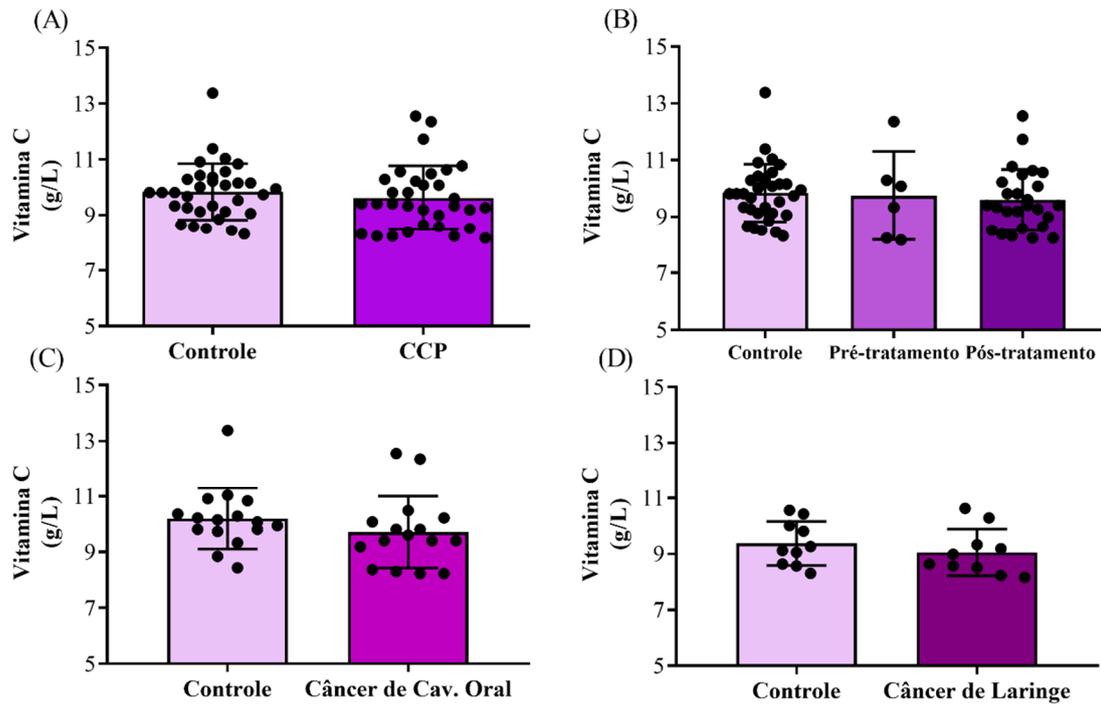
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação de TBARS em amostras de pacientes com CCP indicou um aumento significativo das concentrações de MDA nesse grupo quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$), conforme Fig. 15A. A avaliação desse marcador considerando os grupos pré e pós-tratamento, câncer de cavidade oral e câncer de laringe, Fig. 15B-D, indicou um aumento deste parâmetro nos grupos com tumores, porém sem significância estatística ($p > 0,05$). Esses resultados indicam a presença de dano oxidativo às biomoléculas de lipídeos e às membranas celulares em CCP.

Concentração de proteínas totais

A figura 16A-D ilustra a concentração de proteínas totais, indicando níveis significativamente reduzidos em CCP ($p < 0,05$; Fig. 16A), porém não foram observadas alterações avaliando-se a variável tratamento e em pacientes com câncer de cavidade oral e câncer de laringe ($p > 0,05$; Fig. 16B-D).

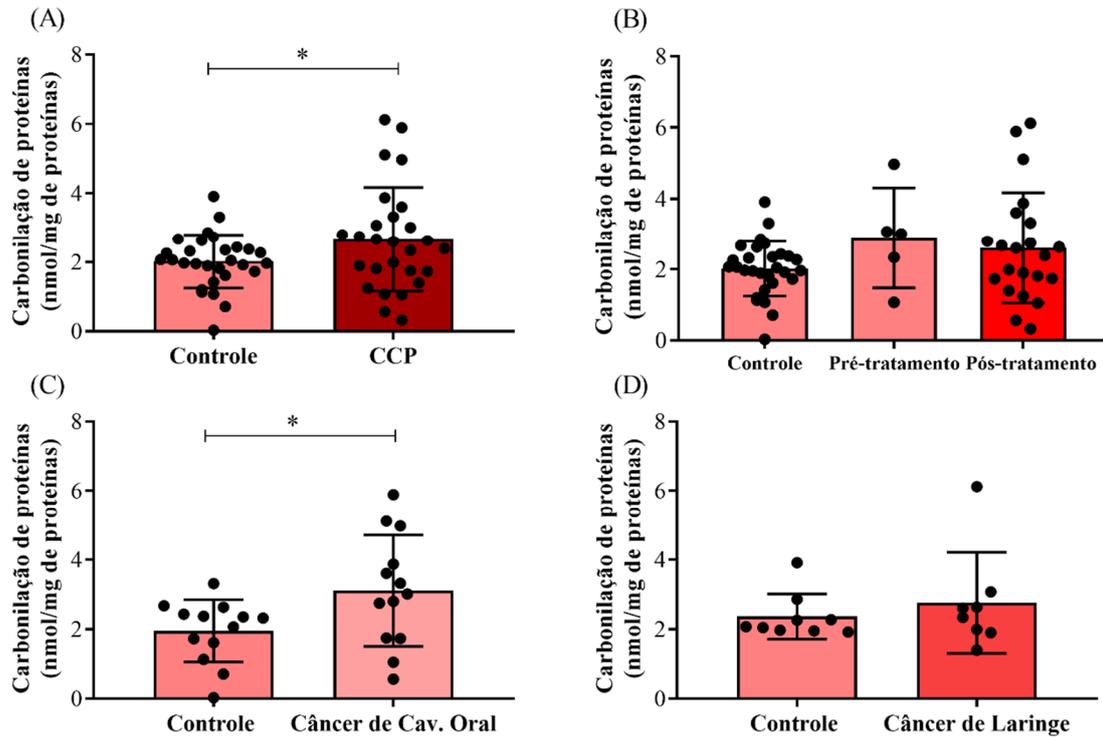
Figura 13 – Conteúdo de ácido ascórbico/vitamina C



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Conteúdo de ácido ascórbico/vitamina C (A-D) em amostras de plasma. (A) Pacientes com CCP (n = 32) e controles saudáveis (n = 33); (B) pacientes CCP pré e pós-tratamento (n = 6 e 26, respectivamente) e controles saudáveis (n = 33). (C) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 16) e controles saudáveis (n = 16). (D) Pacientes com câncer de laringe (n = 10) e controles saudáveis (n = 10). O protocolo laboratorial para a realização das análises está descrito na seção de métodos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. (A, C e D: teste T-Student não pareado; B: ANOVA one-way, com Tukey como teste post hoc).

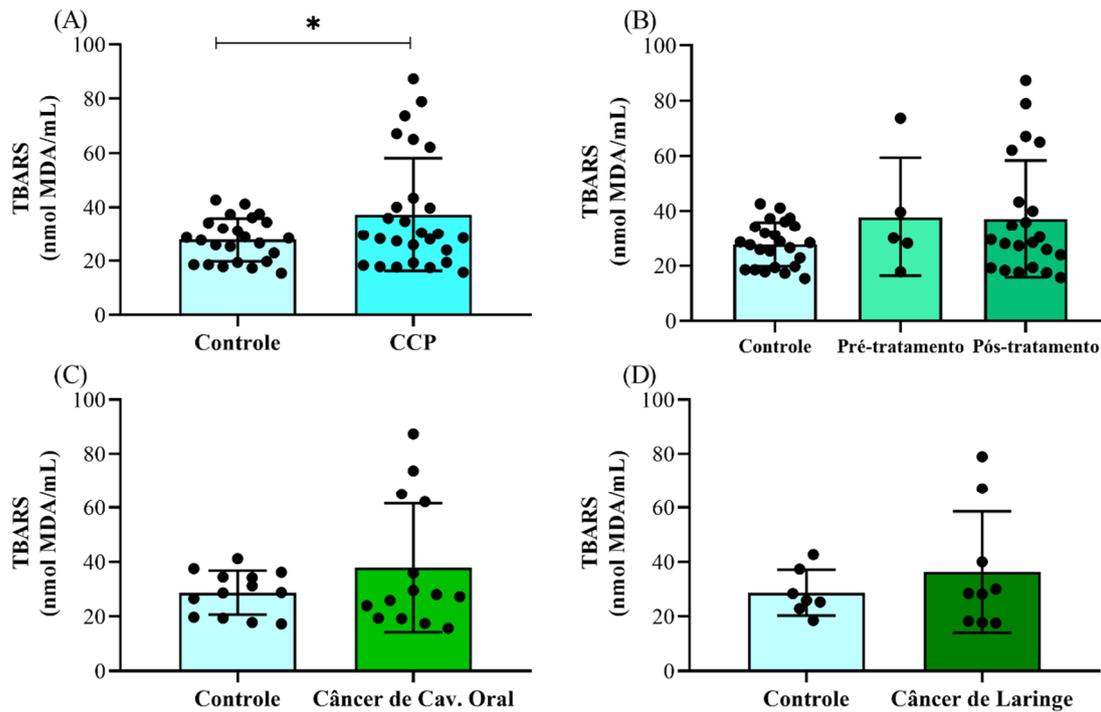
Figura 14 – Níveis de carbonilação de proteínas



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Carbonilação de proteínas (A-D) em amostras de soro. (A) Pacientes com CCP (n = 27) e controles saudáveis (n = 29); (B) pacientes CCP pré e pós-tratamento (n = 5 e 22, respectivamente) e controles saudáveis (n = 29). (C) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 14) e controles saudáveis (n = 13). (D) Pacientes com câncer de laringe (n = 8) e controles saudáveis (n = 9). O protocolo laboratorial para a realização das análises está descrito na seção de métodos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. (A, C e D: teste T-Student não pareado, *p < 0,05; B: ANOVA one-way, com Tukey como teste post hoc).

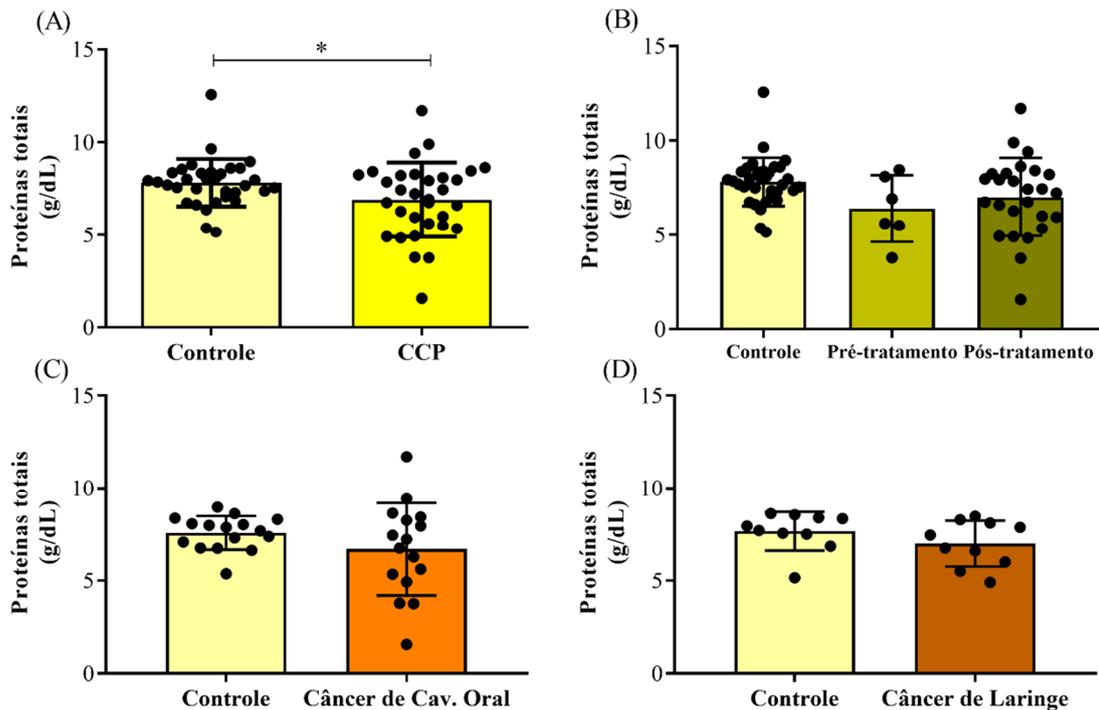
Figura 15 – Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A-D) em amostras de plasma. (A) Pacientes com CCP (n = 27) e controles saudáveis (n = 24); (B) pacientes CCP pré e pós-tratamento (n = 5 e 22, respectivamente) e controles saudáveis (n = 24). (C) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 14) e controles saudáveis (n = 13). (D) Pacientes com câncer de laringe (n = 9) e controles saudáveis (n = 7). O protocolo laboratorial para a realização das análises está descrito na seção de métodos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. (A, C e D: teste T-Student não pareado, $*p < 0,05$; B: ANOVA one-way, com Tukey como teste post hoc).

Figura 16 – Concentração de proteínas totais



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Concentração de proteínas totais (A-D) em amostras de soro. (A) Pacientes com CCP (n = 32) e controles saudáveis (n = 33); (B) pacientes CCP pré e pós-tratamento (n = 6 e 26, respectivamente) e controles saudáveis (n = 33). (C) Pacientes com câncer de cavidade oral (n = 16) e controles saudáveis (n = 16). (D) Pacientes com câncer de laringe (n = 10) e controles saudáveis (n = 10). O protocolo laboratorial para a realização das análises está descrito na seção de métodos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. (A, C e D: teste T-Student não pareado, * $p < 0,05$; B: ANOVA one-way, com Tukey como teste post hoc).

Correlação dos parâmetros de estresse oxidativo e análise de regressão

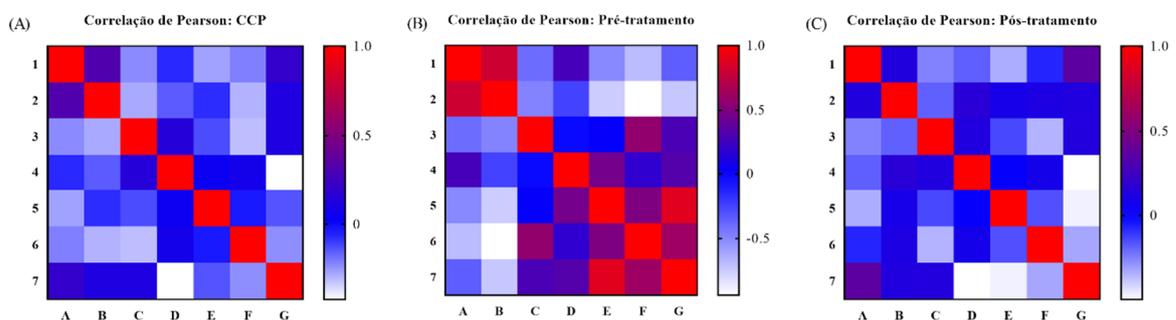
Ao correlacionarmos os parâmetros quantitativos de marcadores de estresse oxidativo observa-se importantes correspondências entre estes, conforme indicado nas matrizes de múltiplas variáveis nas Fig. 17A-C e 18A-B.

A matriz de correlações indica resultados importantes de dependência da atividade da enzima SOD. Esta apresenta uma correlação positiva com a atividade da enzima CAT em indivíduos pré-tratamento e com câncer de laringe ($p < 0,05$; valores de $r = 0,802$ e $0,710$; respectivamente) e uma correlação negativa com NPSH em pacientes com câncer de cavidade oral ($p < 0,05$; valor de $r = -0,586$). Quanto a CAT, sua atividade apresenta também correlação negativa com a carbonilação de proteínas em indivíduos pré-tratamento ($p < 0,05$; valor de $r = -0,936$) e correlação positiva com o PSH no câncer de cavidade oral ($p < 0,05$; valor de $r = 0,649$).

Referente aos demais parâmetros, ainda é possível observar uma correlação positiva da concentração de vitamina C e TBARS em indivíduos pré-tratamento e uma correlação negativa

com os pacientes pós-tratamento ($p < 0,05$; valor de $r = 0,850$ e $-0,467$; respectivamente). Observa-se também uma correlação positiva entre NPSH e a vitamina C em câncer de laringe ($p < 0,05$; valor de $r = 0,646$); além de uma correlação positiva entre NPSH e TBARS ($p < 0,05$; valores de $r = 0,833$) e correlações inversamente proporcionais entre NPSH e TBARS nos grupos CCP e pós-tratamento ($p < 0,05$; valores de $r = -0,417$ e $-0,493$; respectivamente). Os demais parâmetros correlacionados não indicaram diferença significativa ($p > 0,05$).

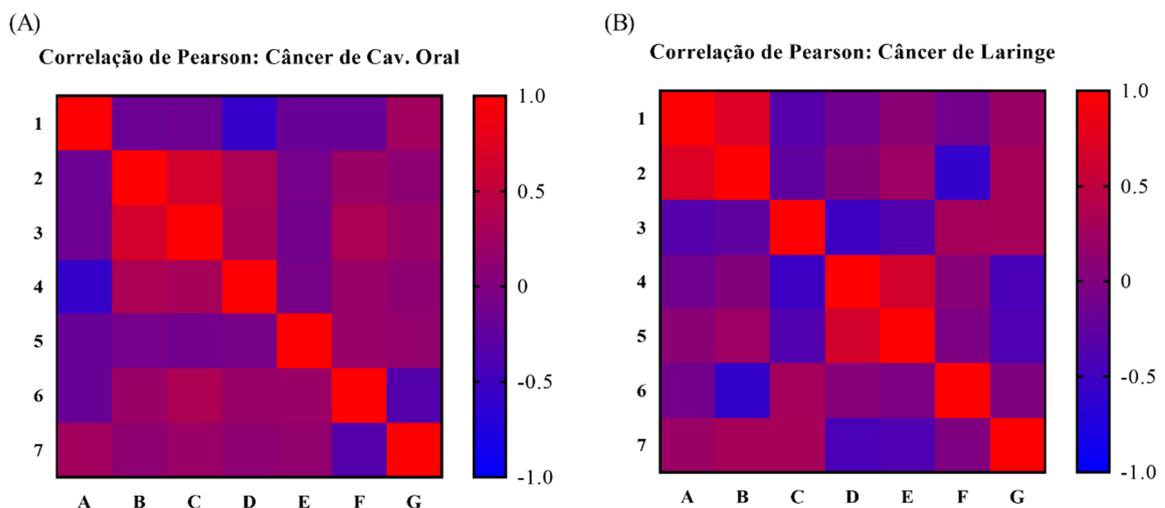
Figura 17 – Correlação de variáveis em câncer de cabeça e pescoço (CCP), pré e pós-tratamento



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Matriz de correlação de variáveis em câncer de cabeça e pescoço (CCP), pré e pós-tratamento (A-C). (1-A) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD); (2-B) Atividade da enzima catalase (CAT); (3-C) Concentração de tióis proteicos (PSH); (4-D) Concentração de tióis não-proteicos (NPSH); (5-E) Conteúdo de ácido ascórbico/vitamina C; (6-F) Carbonilação de proteínas; (7-G) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As variáveis foram correlacionadas pelo teste de correlação de Pearson. A cor vermelha representa uma correlação positiva forte em 1.0, a cor azul representa ausência de correlação em 0 e a cor branca representa uma correlação negativa forte em -1.0.

Figura 18 – Correlação de variáveis em câncer de cavidade oral e câncer de laringe



Fonte: A autora (2022).

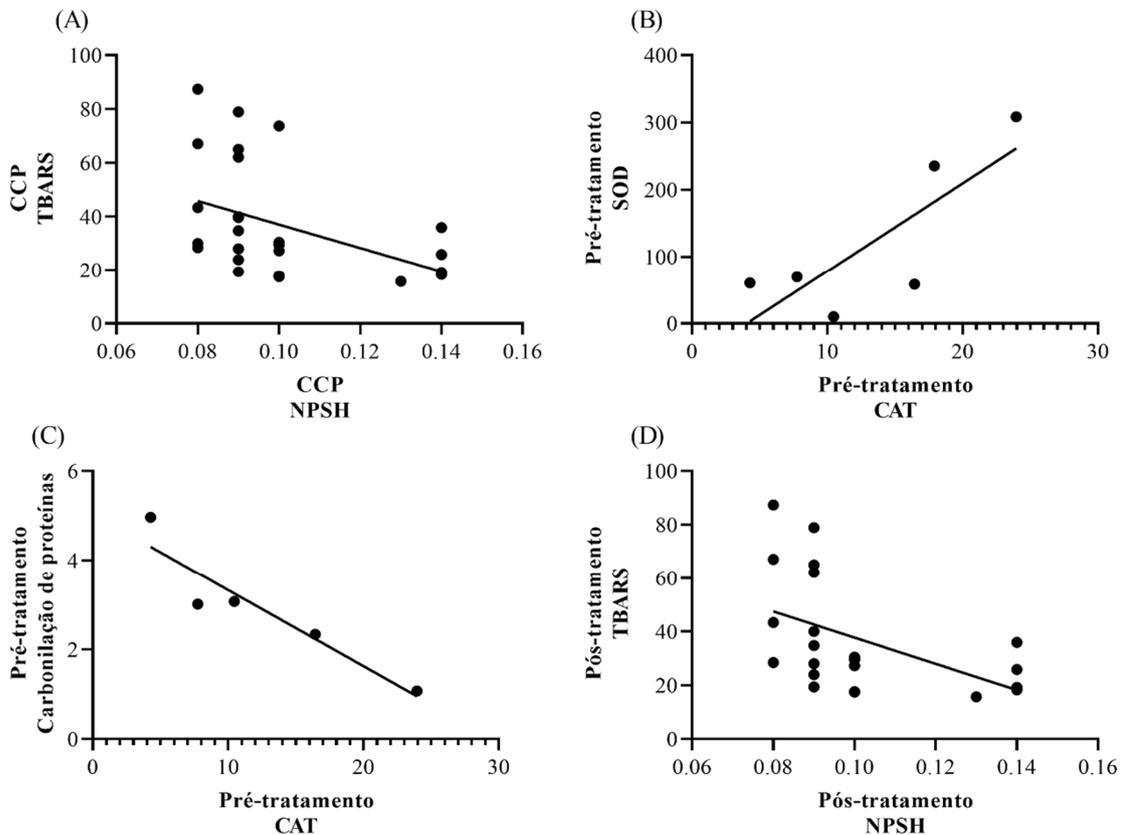
Legenda: Matriz de correlação de variáveis em câncer de cavidade oral (A) e câncer de laringe (B). (1-A) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD); (2-B) Atividade da enzima catalase (CAT); (3-C) Concentração de tióis proteicos (PSH); (4-D) Concentração de tióis não-proteicos (NPSH); (5-E) Conteúdo de

ácido ascórbico/vitamina C; (6-F) Carbonilação de proteínas; (7-G) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As variáveis foram correlacionadas pelo teste de correlação de Pearson. A cor vermelha representa uma correlação positiva forte em 1.0, a escala intermediária entre as cores vermelho/azul representa ausência de correlação em 0 e a cor azul representa uma correlação negativa forte em -1.0.

A presença de correlação entre os parâmetros oxidativos e antioxidantes representa um fator relevante, apesar de alguns destes resultados não apresentarem significância clínica, outros são de extrema aplicabilidade, podendo ser utilizados como preditores de prognóstico nestes pacientes. As figuras 19A-D e 20A-C representam a regressão linear de parâmetros de interesse clínico, no qual observa-se que o aumento dos níveis de NPSH encontra-se associado a diminuição dos níveis de TBARS em CCP e pós-tratamento (Fig. 19A e D; $p < 0,05$; valores de $r = -0,417$ e $-0,493$; valores de R-quadrado = $0,1742$ e $0,2426$; respectivamente), o aumento dos níveis de NPSH também associavam-se positivamente ao aumento dos níveis de vitamina C em câncer de laringe (Fig. 20C; $p < 0,05$; valor de $r = 0,646$; valor de R-quadrado = $0,4173$).

Os resultados indicam que a atividade das enzimas antioxidantes também está significativamente correlacionada com outros parâmetros, sendo que a análise de regressão linear demonstrou que o aumento da atividade da enzima SOD está correlacionado ao aumento da atividade da enzima CAT em pacientes pré-tratamento e em câncer de laringe (Fig. 19B e 20B; $p < 0,05$; valores de $r = 0,802$ e $0,710$; valores de R-quadrado = $0,6439$ e $0,5048$; respectivamente), o aumento da catalase associa-se também a diminuição da carbonilação de proteínas em pacientes pré tratamento (Fig. 19C; $p < 0,05$; valor de $r = -0,936$; valor de R-quadrado = $0,8756$) e o aumento dessa enzima correlaciona-se ao aumento dos níveis de PSH em câncer de cavidade oral (Fig. 20A; $p < 0,05$; valor de $r = 0,649$; valor de R-quadrado = $0,4207$).

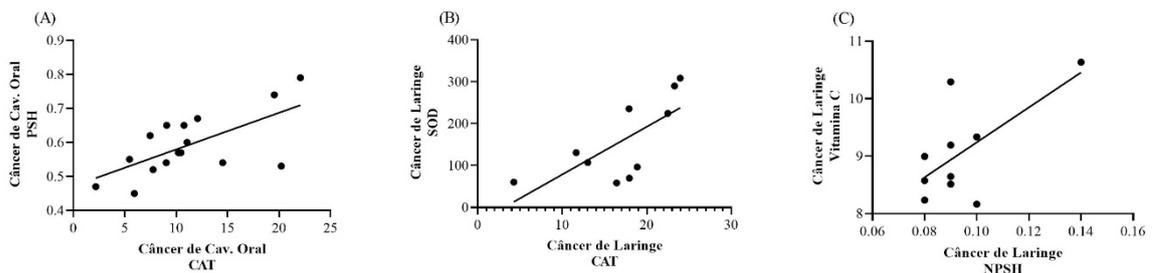
Figura 19 – Regressão linear de variáveis em câncer de cabeça e pescoço (CCP), pré e pós-tratamento



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Gráficos de regressão linear de variáveis que apresentaram diferença estatística na análise de correlação de Pearson (Fig. 7) em câncer de cabeça e pescoço (CCP), pré e pós-tratamento. (A) TBARS e NPSH em CCP (R-quadrado = 0,1742); (B) Atividades das enzimas SOD e CAT em pré-tratamento (R-quadrado = 0,6439); (C) Carbonilação proteica e CAT (R-quadrado = 0,8756); (D) TBARS e NPSH em pacientes pós-tratamento (R-quadrado = 0,2426).

Figura 20 – Regressão linear de variáveis em câncer de cavidade oral e câncer de laringe



Fonte: A autora (2022).

Legenda: Gráficos de regressão linear de variáveis que apresentaram diferença estatística na análise de correlação de Pearson (Fig. 8) em câncer de cavidade oral e câncer de laringe. (A) PSH e CAT em câncer de cavidade oral (R-quadrado = 0,4207); (B) Atividades das enzimas SOD e CAT em câncer de laringe (R-quadrado = 0,5048); (C) Conteúdo de vitamina C e NPSH (R-quadrado = 0,4173).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que marcadores de estresse oxidativo permanecem alterados em CCP, câncer de cavidade e câncer de laringe, mesmo após tratamento. Estes achados indicam que danos oxidativos podem estar intrinsicamente associados não apenas com o desenvolvimento da carcinogênese, mas também com a manutenção e progressão tumoral e desfechos oncológicos desfavoráveis. Conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo, estes pacientes apresentam alterações na sinalização purinérgica, desencadeando um quadro de imunossupressão (MARAFON *et al.*, 2022). Desta forma, compreender os mecanismos sinalizadores do sistema redox permite maior conhecimento biológico e bioquímico destes pacientes, e possibilita indicar estratégias de prognóstico e terapêutica que podem conduzir a um desfecho oncológico favorável.

Os principais resultados encontrados nesse estudo indicam que em todos os tumores avaliados e mesmo após o tratamento temos um comprometimento das defesas antioxidantes indicado pela redução da atividade das principais enzimas do sistema de defesa antioxidante endógeno. A primeira linha de defesa enzimática endógena, representada pela atividade da SOD, encontra-se diminuída em todos os grupos avaliados (CCP, pós-tratamento, no câncer de cavidade oral e no câncer de laringe), promovendo o acúmulo das EROs. Sequencialmente, a atividade da enzima CAT também se apresenta diminuída, o que é estatisticamente verificado no câncer de cavidade oral, sendo que nos pacientes com CCP observa-se que essa enzima também está diminuída, porém sem significância estatística. Corroborando com esses resultados o grupamento PSH também se encontra diminuído em pacientes com câncer de laringe. Todos esses dados indicam uma falha do sistema de defesa antioxidante endógena, fazendo com que pacientes com CCP, com câncer de cavidade oral e com câncer de laringe apresentem comprometimento em seus mecanismos de defesa e estejam mais suscetíveis a danos oxidativos e consequente manutenção de um estado pró-oxidante, favorecendo a manutenção do microambiente tumoral.

Conforme observado no nosso estudo, a ação das enzimas SOD e CAT geralmente ocorre de maneira sinérgica. A SOD representa, a primeira linha de defesa contra as EROs, sendo sua ação através da dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 por sua vez é transformado em H_2O e O_2 pela atuação da CAT. O comprometimento da atividade dessas enzimas ocasionam um escape das EROs, que não são catalisadas e continuam promovendo toxicidade celular (GARGOURI *et al.*, 2009; STRYCHARZ-DUDZIAK *et al.*, 2019).

Ressalta-se que a diminuição da atividade da SOD está associada principalmente aos efeitos destrutivos do superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que, promove desprotonação de resíduos de serina ou treonina, contribuindo para as taxas aceleradas de fosforilação em muitos processos de sinalização oncogênica com subsequente efeito antiapoptótico e progressão tumoral (ZAHRA *et al.*, 2021).

Embora a diminuição das atividades enzimáticas antioxidantes seja provavelmente uma consequência do câncer e não uma causa subjacente, entender sua atuação na eliminação de radicais carcinogênicos e quais agentes podem atuar promovendo o aumento desta atividade enzimática em populações de alto risco, representa uma abordagem promissora, pois as EROs em quantidades excessivas além de afetar o equilíbrio redox da célula, promovem efeitos deletérios danificando as biomoléculas de DNA, proteínas celulares e lipídios, agravando a patogênese do câncer pela promoção de instabilidade genômica e mudanças nas vias de sinalização, ocasionando ativação inflamatória, atuando no reparo de tecidos, controle da proliferação celular e sobrevivência; afetam a mobilidade celular e invasividade, a angiogênese e diferenciação de células-tronco basais, promovendo assim, o crescimento tumoral (ALFOUZAN, 2019; AUSONI *et al.*, 2016; CHAVES *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; KONINGS *et al.*, 2020; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018; MALIK *et al.*, 2014; TAMPA *et al.*, 2018).

Ressalta-se que neste estudo indicou-se um aumento do dano oxidativo, o qual é observado pelo aumento da carbonilação de proteínas em CCP e câncer de cavidade oral, sendo que pacientes com câncer de laringe e aqueles submetidos ao tratamento apresentaram aumento da carbonilação, porém sem significância estatística. Outro parâmetro oxidativo que apresentou-se alterado compreende o TBARS em CCP, este parâmetro também está alterado nos demais grupos (câncer de cavidade oral, câncer de laringe e após o tratamento), porém sem significância estatística.

O aumento de TBARS representa um importante marcador de dano oxidativo, demonstrando que as EROs promovem peroxidação lipídica nas membranas celulares, sendo que esses subprodutos, o MDA juntamente com hidroperóxidos lipídicos, promovem modulação do crescimento celular e progressão do tumor pois promovem a ativação de vias de transdução de sinal, além de serem considerados agentes co-carcinogênicos, pois apresentam alta citotoxicidade. Desta forma, esse marcador pode ser considerado um bom preditor para avaliação do grau de lesão tecidual relacionada ao estresse oxidativo (DHAMA *et al.*, 2019; MOHIDEEN *et al.*, 2021; NEGANOVA *et al.*, 2021; NUSZKIEWICZ *et al.*, 2021).

As proteínas são um dos principais alvos celulares iniciais das EROs, as quais promovem perda de resíduos de histidina, cisão oxidativa, introdução de grupos carbonila e formação de radicais, resultando na fragmentação, reticulação e agregação dessas proteínas, podendo danificar até mesmo proteínas com função de reparo ao DNA. A presença de carbonilação proteica é indicada como um sinal de disfunção associada à doença. Sendo assim, a avaliação desse marcador também representa um importante preditor para avaliação dos pacientes com câncer (CHOUDHARI *et al.*, 2014).

Considera-se que subprodutos do dano oxidativo, TBARS e carbonilação de proteínas, podem ser amplamente utilizados como marcadores, pois apresentam meia-vida mais longa e maior instabilidade que as EROs, sendo indicadores eficazes do (des)equilíbrio oxidante-antioxidante (DHAMA *et al.*, 2019). Os resultados encontrados em nosso estudo indicam que também em CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe esses produtos representam importantes parâmetros de avaliação e possíveis preditores de prognósticos para os pacientes.

Além dos resultados apresentados para os marcadores pró e antioxidantes, nosso estudo demonstrou uma correlação de variáveis, indicadas pela primeira vez nesse grupo de pacientes, sendo estas, correlações de extrema importância clínica para avaliação dos pacientes e prognóstico. Entre as quais, pacientes pré-tratamento apresentavam aumento da atividade da enzima SOD associado ao aumento da atividade da enzima CAT, o que também foi observado no câncer de laringe, e um aumento da catalase associado também a diminuição da carbonilação de proteínas em pré-tratamento. Indica-se que o aumento das defesas antioxidantes pré-tratamento pode representar uma tentativa de resposta biológica compensatória do organismo frente ao dano oxidativo.

Pacientes com CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe apresentaram diminuição das defesas antioxidantes e aumento do dano oxidativo, mas as correlações entre os parâmetros indicaram que aumento dos níveis de NPSH encontrava-se associada a diminuição dos níveis de TBARS em CCP e pós-tratamento, sendo que o aumento dos níveis de NPSH também associava-se positivamente ao aumento dos níveis de vitamina C em câncer de laringe, e o aumento dos níveis de PSH associava-se positivamente ao aumento da CAT em câncer de cavidade oral. Esses resultados são indicativos que uma abordagem terapêutica adjuvante que busque o aumento dos grupos PSH e NPSH tem o potencial de promover nesses pacientes uma diminuição do dano oxidativo e conseqüentemente um melhor prognóstico e desfecho oncológico.

Outros autores encontram resultados semelhantes ao nosso estudo. Gargouri e colaboradores, verificaram parâmetros oxidativos em pacientes com carcinoma de nasofaringe.

Os autores observaram que a atividade da CAT eritrocitária e tumoral foi significativamente menor nos pacientes em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), e observaram altos níveis de MDA plasmático, pela análise de TBARS, porém diferente de nosso estudo os autores verificaram um aumento da atividade da enzima SOD no grupo de pacientes ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (GARGOURI *et al.*, 2009). Korde *et al.* avaliaram pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral (CEC) e observaram um aumento dos níveis MDA e óxido nítrico total, associado a uma diminuição da capacidade antioxidante total no soro e tecido de pacientes com CEC, indicando uma correlação positiva dos marcadores pró-oxidantes e o desarranjo das defesas antioxidantes (KORDE *et al.*, 2011).

Gokul *et al.* e Hou *et al.* encontraram resultados similares, ambos procederam a avaliação de marcadores oxidativos em CEC e observaram níveis de MDA e óxido nítrico significativamente elevados nas amostras de sangue e tecido de pacientes com CEC. Na avaliação das enzimas antioxidantes SOD e CAT, estas foram significativamente menores nas amostras de tecido, enquanto nos eritrócitos, os níveis de CAT foram significativamente reduzidos e os níveis de SOD foram mais elevados em CEC em comparação com os controles saudáveis (GOKUL *et al.*, 2010; HUO *et al.*, 2014).

Indica-se que SOD apresenta-se diminuída também em um conjunto de outros tumores, como carcinoma de mama, adenocarcinoma gástrico, hepatocarcinogênese, câncer de pele (ZAHRA *et al.*, 2021). Essa discrepância nos valores de SOD já foi relatada anteriormente, podendo estar relacionada a amostra biológica utilizada, onde alguns autores procederam as dosagens em plasma, eritrócitos e em tecido, os autores aqui citados indicam que o aumento de SOD pode representar uma resposta compensatória à produção de EROs ou estar associado à diferenças genéticas, porém nosso estudo demonstrou, que a atividade da SOD está diminuída em todos os grupos avaliados (CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe), indicando que estes pacientes podem apresentar um pior prognóstico em decorrência da diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas, promovendo o acúmulo de EROs e consequente manutenção do dano oxidativo crônico.

Sehitogullari *et al.* em estudo com carcinoma espinocelular de esôfago verificou que as atividades de paraoxonase (PON), SOD, glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona redutase (GR) ($p < 0,05$) encontravam-se significativamente menores nos pacientes em relação ao controle sendo que os níveis séricos de MDA foram significativamente maiores ($p < 0,05$). Indicando também uma correlação desse marcador de estresse oxidativo com as atividades enzimáticas de paraoxonase ($r = -0,572$, $P < 0,001$) e arilesterase ($r = -0,597$, $P < 0,001$) (SEHITOGULLARI *et al.*, 2014). No estudo de Malik *et al.*, em CEC, a atividade da PON

também estava diminuída, os níveis de MDA elevados, e o nível total de EROs significativamente aumentado, sugerindo assim, um aumento do estresse oxidativo em indivíduos cancerosos. Os autores também procederam uma correlação as concentrações séricas de MDA e a atividade de PON, e indicaram que estas variáveis são inversamente correlacionadas (MALIK *et al.*, 2014). Em nosso estudo indica-se que os níveis de MDA e NPSH também encontravam-se inversamente correlacionados.

Diferentemente de nosso estudo, Mutlu e colaboradores ao avaliar as enzimas antioxidantes em CCP, encontraram apenas diminuição da atividade da PON1, as demais enzimas, anidrase carbônica, xantina oxidase e CAT não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controle (MUTLU *et al.*, 2018).

Alguns resultados similares ao nosso foram observados pelos autores Strycharz-Dudziak, e colaboradores em dois estudos (STRYCHARZ-DUDZIAK *et al.*, 2019; STRYCHARZ-DUDZIAK *et al.*, 2020), os quais indicaram níveis significativamente diminuídos de capacidade antioxidante total, atividade de GSH-Px e da SOD em tecido de câncer de orofaringe com coinfeção pelo vírus Epstein-Barr/vírus do papiloma humano (EBV/HPV) em comparação com pacientes com infecção por EBV ou HPV. Nuszkiewicz *et al.* avaliaram além de marcadores de estresse oxidativo, as concentrações de vitamina D, osteopontina e melatonina em pacientes com cânceres de lábio, cavidade oral e faringe; e os resultados mostraram uma diminuição das concentrações de vitamina D e CAT, e um aumento de osteopontina e MDA plasmático (NUSZKIEWICZ *et al.*, 2021).

Um importante estudo apresentado por Mohideen, e colaboradores, compreendeu uma revisão sistemática referente aos níveis de MDA nos grupos com CEC, e indicou que estes encontram-se significativamente aumentados ($p < 0,00001$) nas amostras de plasma, soro e saliva quando comparados aos grupos controle, na maioria dos estudos avaliados, conforme observado também em nosso estudo. Considerando que esse marcador reflete com precisão o nível elevado de estresse oxidativo dos pacientes, os autores sugerem que a correlação desse composto com marcadores de prognósticos clínico-patológicos pode auxiliar na formulação de prognósticos baseados no quadro de estresse oxidativo e planejamento de tratamento (MOHIDEEN *et al.*, 2021).

Portanto, nosso estudo demonstrou um dano oxidativo crônico e comprometimento do sistema de defesa antioxidante endógeno em câncer de cabeça e pescoço, câncer de cavidade oral e câncer de laringe, o qual pode ser considerado crucial na promoção e progressão da tumorigênese.

CONCLUSÃO

Os marcadores de parâmetros oxidativos indicaram importantes alterações nos pacientes avaliados, sugerindo um comprometimento dos sistemas de defesa antioxidante, pela diminuição da atividades das enzimas SOD, CAT e dos níveis de PSH; associado a um maior dano oxidativo pelo aumento da carbonilação proteica e de TBARS, promovendo assim a manutenção de microambiente pró-oxidativo e favorável para a progressão e recorrência tumoral. A correlação das variáveis indicou que promover o aumento das concentrações de PSH e NPSH pode representar uma estratégia farmacológica de interesse para tratamento coadjuvante desses tumores, diminuindo os danos oxidativos. Esses resultados apontam o caminho para compreensão da aplicabilidade desses marcadores no diagnóstico desses tumores e para desenvolvimento de estratégias terapêuticas de manejo dos pacientes e predição do prognóstico em CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe durante o tratamento e após a remoção do tumor.

5. CONCLUSÃO

Os tumores de cabeça e pescoço compreendem neoplasias com diagnóstico tardio e potencialmente fatal, baixa sobrevida, estando associados a tratamentos complexos e debilitantes, além de inúmeros efeitos colaterais, comprometimento funcional e bioquímico, representando um grave problema de saúde. Desta forma, o presente estudo possibilitou uma melhor compreensão do perfil destes pacientes e dos mecanismos bioquímicos associados a esses tumores, permitindo identificar marcadores laboratoriais que apresentaram-se alterados frente a esses tumores, os quais constituem indicativos de avaliação do prognóstico destes pacientes. Assim, conclui-se que:

- O perfil dos pacientes com CCP identificou as principais características sociodemográficas deste grupo, fatores estes que constituem variáveis de interesse para elaboração de estratégias preventivas e de diagnóstico precoce para o CCP;
- A avaliação dos componentes do sistema de sinalização purinérgica indicou alterações nessa via sinalizadora. A análise do perfil inflamatório indicou um aumento de marcadores associados a imunossupressão. Conjuntamente, esses resultados sugerem um acúmulo de adenosina no ambiente extracelular em CCP, componente este que promove a imunossupressão do TME e está associado à progressão tumoral, crescimento, invasão, metástase e evasão imunológica;
- A avaliação dos marcadores de perfil oxidativo indicou a presença de comprometimento do sistema de defesa antioxidante e presença de dano oxidativo, mesmo após a remoção tumoral, representando assim, a presença de estresse oxidativo em todos os estágios tumorais de CCP, incluindo a promoção e progressão tumoral.

Portanto, nossos resultados indicaram importantes alterações na sinalização purinérgica e no perfil oxidativo-inflamatório de pacientes com CCP, câncer de cavidade oral e câncer de laringe, estas alterações podem representar um desfecho oncológico desfavorável aos pacientes, pois a manutenção de um microambiente imunossupressor e com elevado estresse oxidativo favorece a progressão tumoral, crescimento, invasão e metástases. Assim, os marcadores avaliados podem ser utilizados como biomarcadores de avaliação, acompanhamento e prognóstico desses pacientes, permitindo a melhor compreensão do estado de saúde-doença destes, e futuramente podendo constituir alvos terapêuticos na elaboração de estratégias de manejo, diagnóstico precoce e melhora da qualidade de vida dos pacientes com CCP.

REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 64, n. 3, p. 445–475, 1994.
- ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. **National Medical Journal of India**, v. 13, n. 6, p. 304–310, 2012.
- ALFOUZAN, A. F. Head and neck cancer pathology: Old world versus new world disease. **Nigerian journal of clinical practice**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2019.
- ALLARD, D. *et al.* Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. **Immunology Letters**, v. 205, n. 1, p. 31–39, 2019.
- ALLARD, D.; CHROBAK, P.; STAGG, J. CD73 – adenosine : a next-generation target in immuno-oncology. **Immunotherapy**, v. 73, p. 1–19, 2016.
- ALSAHAFI, E. *et al.* Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 8, 2019.
- ANTONIOLI, L. *et al.* CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, 2013a.
- ARAB, S.; ALIZADEH, A.; ASGHARZADE, S. Tumor-resident adenosine-producing mesenchymal stem cells as a potential target for cancer treatment. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 21, n. 2, p. 205–213, 2021.
- ARAB, S.; HADJATI, J. Adenosine blockage in tumor microenvironment and improvement of cancer immunotherapy. **Immune Network**, v. 19, n. 4, p. 1–19, 2019.
- ARAÚJO NETO, L. A.; TEIXEIRA, L. A. De doença da civilização a problema de saúde pública: câncer, sociedade e medicina brasileira no século XX. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Humanas**, v. 12, n. 1, p. 173-188, 2017.
- AUSONI, S. *et al.* Targeting cellular and molecular drivers of head and neck squamous cell carcinoma: current options and emerging perspectives. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 3, p. 413–426, 2016.
- BAGATINI, M. D. *et al.* **Oxidative Stress: Noxious but Also Vital**. *In*: Novel prospects in oxidative and nitrosative stress. IntechOpen: cap. 1, p. 33, 2017.
- BAGATINI, M. D. *et al.* The impact of purinergic system enzymes on noncommunicable, neurological, and degenerative diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 1, p. 1–21, 2018a.
- BAGATINI, M. D. *et al.* Immune system and chronic diseases 2018. **Journal of Immunology Research**, 2018b.
- BARNARD, E. A.; BURNSTOCK, G.; WEBB, T. E. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n.

3, p. 67–70, 1994.

BOISON, D.; YEGUTKIN, G. G. Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. **Cancer Cell**, v. 36, n. 6, p. 582–596, 2019.

BONO, M. R. *et al.* CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. **FEBS Letters**, v. 589, n. 22, p. 3454–3460, 2015.

BOURS, M. J. *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics** **112**, v. 112, p. 358–404, 2006.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v. 97, p. 77–89, 1968.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL, M. DA S. Conduas do INCA-MS: Carcinoma Epidermoide da Cabeça e Pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 361–376, 2001.

BRASIL, M. DA S. Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil. **INCA: Ministério da Saúde**, v. 1, p. 1–130, 2017.

BRASIL, M. DA S. Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil. **INCA: Ministério da Saúde**, v. 1, p. 1–122, 2019.

BRENNER, D. R. *et al.* A review of the application of inflammatory biomarkers in epidemiologic cancer research. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 23, n. 9, p. 1729–1751, 2014.

BUNBANJERDSUK, S. *et al.* Oncoproteomic and gene expression analyses identify prognostic biomarkers for second primary malignancy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Modern Pathology**, v. 32, n. 1, p. 943–956, 2019.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacolo**, v. 24, p. 509–581, 1972.

BURNSTOCK, G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1127–1139, 1997.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. **Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 1, p. 172–181, 2006a.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 166–176, 2006b.

BURNSTOCK, G. **Purinergic Neurotransmission**. n. 14, p. 60–65, 2009.

- BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Therapeutic developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1–55, 2017.
- BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, p. 1–10, 2018.
- BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 529–564, 2014.
- BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 4, p. 491–540, 2013.
- CAMPOS-CONTRERAS, A. D. R.; DÍAZ-MUÑOZ, M.; VÁZQUEZ-CUEVAS, F. G. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1–24, 2020.
- CANNAVÒ, S. P. *et al.* The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. **Pathology Research and Practice**, v. 215, n. 1, p. 21–28, 2019.
- CASTRO, S. A. *et al.* Ocupações relacionadas ao câncer de cabeça e pescoço em uma cidade do Sul do Brasil , 1998 a 2012. **Rev Bras Med Trab**, v. 17, n. 1, p. 130–135, 2019.
- CHAVES, A. L. F. *et al.* Updates in head and neck cancer: one year in review. **Brazilian Journal of Oncology**, v. 8, p. 1–6, 2018.
- CHEN, F. *et al.* Screening and identification of potential target genes in head and neck cancer using bioinformatics analysis. **Oncology Letters**, v. 18, n. 3, p. 2955–2966, 2019.
- CHEN, X. *et al.* Modulators of redox metabolism in head and neck cancer. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 29, n. 16, p. 1660–1690, 2018.
- CHEW, V.; TOH, H. C.; ABASTADO, J. P. Immune microenvironment in tumor progression: Characteristics and challenges for therapy. **Journal of Oncology**, v. 1, p. 1–10, 2012.
- CHOUDHARI, S. K. *et al.* Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. **Oral Oncology**, v. 50, n. 1, p. 10–18, 2014.
- COCA-PELAZ, A. *et al.* Head and Neck Cancer: A Review of the Impact of Treatment Delay on Outcome. **Advances in Therapy**, v. 35, n. 2, p. 153–160, 2018.
- CONTI, P. *et al.* IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. **Immunology Letters**, v. 88, n. 3, p. 171–174, 2003.
- DE LEVE, S.; WIRSDÖRFER, F.; JENDROSSEK, V. Targeting the immunomodulatory CD73/adenosine system to improve the therapeutic gain of radiotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-21, 2019.
- DE MARCHI, E. *et al.* The P2X7 receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment. **Oncogene**, v. 38, n. 19, p. 3636–3650, 2019.

DHAMA, K. *et al.* Biomarkers in stress related diseases/disorders: Diagnostic, prognostic, and therapeutic values. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, p. 1-50, 2019.

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, 2018.

DI VIRGILIO, F. *et al.* A rationale for targeting the P2X7 receptor in Coronavirus disease 19 (Covid-19). **British Journal of Pharmacology**, v. 19, p. 1–17, 2020.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, n. 3, p. 293–303, 2017.

DI VIRGILIO, F.; BOREA, P. A.; ILLES, P. P2 receptors meet the immune system. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 5–7, 2001.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 191, p. 117–123, 2015.

DILLARD, C. *et al.* Expression pattern of purinergic signaling components in colorectal cancer cells and differential cellular outcomes induced by extracellular atp and adenosine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, 2021.

DOMINGO-VIDAL, M. *et al.* Cigarette smoke induces metabolic reprogramming of the tumor stroma in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer Research**, v. 17, n. 9, p. 1893–1909, 2019.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

FECHNER, R. E. A brief history of head and neck pathology. **Modern Pathology**, v. 15, n. 3, p. 221–228, 2002.

FERRAGUTI, G. *et al.* Alcohol and Head and Neck Cancer: Updates on the Role of Oxidative Stress, Genetic, Epigenetics, Oral Microbiota, Antioxidants, and Alkylating Agents. **Antioxidants**, v. 11, n. 1, 2022.

FERRIS, R. L. Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 29, p. 3293–3304, 2015.

FLINN, A. M.; GENNERY, A. R. Adenosine deaminase deficiency: A review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 13, n. 1, p. 5–11, 2018.

FORMAN, H. J.; URSINI, F.; MAIORINO, M. An overview of mechanisms of redox signaling. **J Mol Cell Cardiol**, v. 25, n. 8, p. 713–724, 2014.

GALBIATTI, A. L. S. *et al.* Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239–247, 2013.

GANCI, F. *et al.* Altered peritumoral microRNA expression predicts head and neck cancer

patients with a high risk of recurrence. **Modern Pathology**, v. 30, n. 10, p. 1387–1401, 2017.

GARGOURI, B. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant system in the tumor and in the blood of patients with nasopharyngeal carcinoma. **Biological Trace Element Research**, v. 132, n. 1–3, p. 27–34, 2009.

GIULIANI, A. L.; SARTI, A. C.; DI VIRGILIO, F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. **Immunology Letters**, v. 205, n. 1, p. 16–24, 2019.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colorimetric method. **In HU Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis**, v. 4, p. 315–323, 1984.

GOKUL, S. *et al.* Oxidant-antioxidant status in blood and tumor tissue of oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Diseases**, v. 16, n. 1, p. 29–33, 2010.

GOVENDER, R. *et al.* Identification of behaviour change components in swallowing interventions for head and neck cancer patients: protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2015.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, 2020.

HOWES, N. *et al.* **Immunonutrition for patients undergoing surgery for head and neck cancer (Review)**. Cochrane Database of Systematic Reviews, n. 8, p. 1–112, 2018.

HOWREN, M. B. *et al.* Psychological Factors Associated with Head and Neck Cancer Treatment and Survivorship: Evidence and Opportunities for Behavioral Medicine. **J Consult Clin Psychol**, v. 81, n. 2, p. 299–317, 2013.

HUANG, Z. *et al.* From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 2021.

HUO, W. *et al.* Antioxidant enzyme levels in pathogenesis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Drug Res (Stuttg)**, v. 64, n. 11, p. 629–32, 2014.

JACQUES-SILVA, M. *et al.* Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharm. Toxicol.**, v. 88, p. 119–125, 2001.

JADIDI-NIARAGH, F. Potential of CD73 as a target for cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 11, n. 16, p. 1353–1355, 2019.

JAGANJAC, M. *et al.* Granulocytes as effective anticancer agent in experimental solid tumor models. **Immunobiology**, v. 215, n. 12, p. 1015–1020, 2010.

JENTZSCH, A. M. *et al.* Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 2, p. 251–256, 1996.

JIANG, T. *et al.* Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

JOHNSON, D. E. *et al.* Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Nat Rev Dis Primers.**, v. 6, n. 1, p. 63–88, 2021.

JOSHI, P. *et al.* Head and Neck Cancers in Developing Countries. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 5, n. 2, p. 1-6, 2014.

KATAKWAR, P. *et al.* Oxidative stress marker in oral cancer: A review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 438–446, 2016.

KONINGS, H. *et al.* A Literature Review of the Potential Diagnostic Biomarkers of Head and Neck Neoplasms. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. June, 2020.

KORDE, S. D. *et al.* Enhanced nitrosative and oxidative stress with decreased total antioxidant capacity in patients with oral precancer and oral squamous cell carcinoma. **Oncology**, v. 80, n. 5–6, p. 382–389, 2011.

KRUK, J.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Carcinogenesis: Implications of Oxidative Stress on the Progression and Development of Several Cancer Types. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 904–919, 2017.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9–22, 2011.

LEEMANS, C. R.; SNIJDERS, P. J. F.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 5, p. 269–282, 2018.

LEONE, R. D.; EMENS, L. A. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2018.

LEVINE, R. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464–78, 1990.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757–772, 2018.

LU, H. J. *et al.* Clinical, pathophysiologic, and genomic analysis of the outcomes of primary head and neck malignancy after pulmonary metastasectomy. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

LUDWIG, N. *et al.* Purine Metabolites in Tumor-Derived Exosomes May Squamous Cell Carcinoma. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1602, 2020.

LUNKES, G. I. *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189–194, 2003.

MACFARLANE, T. V. *et al.* Head and Neck Cancer Pain: Systematic Review of Prevalence and Associated Factors. **Journal of Oral and Maxillofacial Research**, v. 3, n. 1, 2012.

MAIA, F. M. M.; SANTOS, E. B.; REIS, G. Estresse oxidativo e lipoproteínas plasmáticas

em pacientes com câncer. **Einstein**, v. 12, n. 4, 2014.

MALIK, U. U. *et al.* Measurement of serum paraoxonase activity and MDA concentrations in patients suffering with oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 430, p. 38–42, 2014.

MANICA, A. *et al.* High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 5, p. 3980–3988, 2018.

MÂNICA, A. *et al.* The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. **Cellular Signalling**, v. 59, n. March, p. 122–130, 2019.

MARAFON, F. *et al.* Deregulation of purinergic ectoenzyme activity in head and neck cancer promotes immunosuppression. **Molecular Biology Reports**, 2022.

MARTIN, H. Richard Wiseman on cancer. **Cancer**, v. 4, n. 5, p. 907–912, 1951.

MARTINS, C. C. *et al.* Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 454, p. 66–71, 2016.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, n. 3, p. 386–396, 2016.

MASOUDI, S. *et al.* A new approach to survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma. **Archives of Iranian Medicine**, v. 20, n. 8, p. 503–510, 2017.

MELLO, P. DE A.; COUTINHO-SILVA, R.; SAVIO, L. E. B. Multifaceted effects of extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor – Host interaction and Therapeutic Perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–17, 2017.

METCALF, J. A. *et al.* Myeloperoxidase functional assays. In: **Laboratory Manual of Neutrophil Function**, Raven Press. [s.l: s.n.]. p. 150–151, 1986.

MIRANDA-GALVIS, M. *et al.* Impacts of environmental factors on head and neck cancer pathogenesis and progression. **Cells**, v. 10, n. 389, p. 1–16, 2021.

MISRA, H.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

MOHIDEEN, K. *et al.* Malondialdehyde, an oxidative stress marker in oral squamous cell carcinoma—A systematic review and meta-analysis. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 1019–1035, 2021.

MUTLU, M. *et al.* Do CO₂ and oxidative stress induce cancer?: a brief study about the evaluation of PON 1, CAT, CA and XO enzyme levels on head and neck cancer patients. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 459–464, 2018.

NDREPEPA, G. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with

cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 493, n. February, p. 36–51, 2019.

NEGANOVA, M. et al. Therapeutic influence on important targets associated with chronic inflammation and oxidative stress in cancer treatment. **Cancers**, v. 13, n. 23, p. 1–41, 2021.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474–478, 1972.

NG, S. P. et al. Risk of second primary malignancies in head and neck cancer patients treated with definitive radiotherapy. **Nature Precision Oncology**, v. 1, p. 1–6, 2019.

NIH. **Head and Neck Cancer – Patient Version**. National Cancer Institute. 2019. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/head-and-neck>> Acesso em: 02 de dez. de 2019.

NUSZKIEWICZ, J. et al. Parameters of Oxidative Stress, Vitamin D, Osteopontin, and Melatonin in Patients with Lip, Oral Cavity, and Pharyngeal Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

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, 2018.

PERILLO, B. et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 192–203, 2020.

PFAFFENZELLER, M. S.; FRANCIOSI, M. L. M.; CARDOSO, A. M. Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical Cancer. **Purinergic Signalling**, p. 12–14, 2020.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225–230, 1996.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacology**, v. 50, p. 413–492, 1998.

RIPPHAUSEN, P. et al. Virtual screening identifies novel sulfonamide inhibitors of ecto -5'-nucleotidase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6576–6581, 2012.

SABATINI, M. E.; CHIOCCA, S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. **Br J Cancer**, v. 1, n. 1, 2019.

SARAIVA, M. et al. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, p. 1–19, 2020.

- SBCCP. Sobre a Sociedade. **Sociedade Brasileira de Câncer de Cabeça e Pescoço**. 2018. Disponível em: <<https://sbccp.org.br/institucional/sobre-a-sociedade/>>. Acesso em: 02 de dez. de 2019.
- SCHACHTER, J. *et al.* Inhibition of ecto-ATPase activities impairs HIV-1 infection of macrophages. **Immunobiology**, v. 220, n. 5, p. 589–596, 2015.
- SCHETINGER, M. R. C. *et al.* NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **BioFactors**, v. 31, n. 2, p. 77–98, 2007.
- SEHITOGULLARI, A. *et al.* Serum paraoxonase-1 enzyme activities and oxidative stress levels in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Redox Report**, v. 19, n. 5, p. 199–205, 2014.
- SEK, K. *et al.* Targeting adenosine receptor signaling in cancer immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.
- SHARIFI-RAD, M. *et al.* Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 1–21, 2020.
- SHIN, J. M. *et al.* Metabolomics of head and neck cancer: A mini-review. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–8, 2016.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.
- SIES, H. **Oxidative stress**: introductory remarks. Academic Press; London: 1985.
- SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.
- SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.
- SILVA, C. T. DA; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38–42, 2014.
- SOUZA, V. DO C. G. *et al.* Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 4, p. 753–762, 2012.
- SOUZA, V. DO C. G. *et al.* Evaluation of P2X7 receptor expression in peripheral lymphocytes and immune profile from patients with indeterminate form of Chagas disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 32–38, 2017.
- STRYCHARZ-DUDZIAK, M. *et al.* Total Antioxidant Status (TAS), Superoxide Dismutase (SOD), and Glutathione Peroxidase (GPx) in Oropharyngeal Cancer Associated with EBV Infection. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

STRYCHARZ-DUDZIAK, M. *et al.* Glutathione Peroxidase (GPx) and Superoxide Dismutase (SOD) in Oropharyngeal Cancer Associated with EBV and HPV Coinfection. **Viruses**, v. 12, n. 9, p. 1–10, 2020.

TAMPA, M. *et al.* Mediators of inflammation – A potential source of biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, 2018.

THEODORAKI, M. N. *et al.* Exosomes in HNSCC plasma as surrogate markers of tumour progression and immune competence. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 194, n. 1, p. 67–78, 2018.

THOMPSON, P. A. *et al.* Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 36, p. S232–S253, 2015.

THURAIAYAH, J. *et al.* Involvement of adenosine signaling pathway in migraine pathophysiology: a systematic review of preclinical studies. **Journal of Headache and Pain**, v. 23, n. 1, p. 1–12, 2022.

TORRES-PINEDA, D. B. *et al.* Adenosine augments the production of IL-10 in cervical cancer cells through interaction with the A2B adenosine receptor, resulting in protection against the activity of cytotoxic T cells. **Cytokine**, v. 130, n. 160, p. 155082, 2020.

VIGANO, S. *et al.* Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-Cell function. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–30, 2019.

VIJAYAN, D. *et al.* Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 12, p. 709–724, 2017.

VIVIANI, L. G. *et al.* Virtual Screening Approach for the Identification of Hydroxamic Acids as Novel Human Ecto-5'-Nucleotidase Inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 621–630, 2020.

WEN, Y.; GRANDIS, J. R. Emerging drugs for head and neck cancer. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 20, n. 2, p. 313–329, 2015.

WHITESIDE, T. L. Head and neck carcinoma immunotherapy: Facts and hopes. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 1, p. 6–13, 2018.

WHO. **Global Cancer Observatory**. International Agency for Research on Cancer. Organization World Health. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 04 de julho de 2022.

YANG, F. *et al.* Prevalence of human papillomavirus type-18 in head and neck cancer among the Chinese population: A PRISMA-compliant meta-analysis. **Medicine**, v. 98, n. 8, p. 1–7, 2019.

YE, Y. *et al.* Adenosine triphosphate drives head and neck cancer pain through P2X_{2/3} heterotrimers. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2014.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside - converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673–69, 2008.

YEGUTKIN, G. G.; BOISON, D. ATP and Adenosine Metabolism in Cancer: Exploitation for Therapeutic Gain. **Pharmacological reviews**, v. 74, n. 3, p. 797–822, 2022.

ZAHRA, K. F. *et al.* The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology: A Double View on the Role of the Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

ZANINI, D. *et al.* Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, n. 1, p. 40–45, 2012.

ZANINI, D. *et al.* ADA activity is decreased in lymphocytes from patients with advanced stage of lung cancer. **Medical Oncology**, v. 36, n. 9, p. 1–8, 2019.

ZHAO, S. *et al.* Serum IL-10 predicts worse outcome in cancer patients: A meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015.