

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROFESSOR TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE E DA NTPDase3
NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE BEXIGA**

Tese de Doutorado

LILIANA ROCKENBACH

Porto Alegre, 2016.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROFESSOR TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE E DA NTPDase3
NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE BEXIGA**

LILIANA ROCKENBACH

Orientadora: Profa. Dr. Ana Maria Oliveira Battastini

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial à obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Porto Alegre, 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

Rockenbach, Liliana
CARACTERIZAÇÃO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE E DA
ENTPDase3 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE BEXIGA /
Liliana Rockenbach. -- 2016.
131 f.

Orientador: Ana Maria Oliveira Battastini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Sistema Purinérgico. 2. ecto-5'-nucleotidase.
3. ENTPDase3. 4. Câncer de bexiga. I. Battastini, Ana
Maria Oliveira, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A Deus, à minha família amada, aos amigos queridos e a todos aqueles que reconhecem que não há trabalho ou ato mais valioso do que o realizado com amor e por amor, e não há herói mais grandioso do que aquele que age assim constantemente, superando-se a cada dia e aos poucos mudando o mundo a sua volta através do exemplo.

“Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, pois Tu
estás comigo” (Salmos 23:4).

v

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, porque ao longo da vida Ele está sempre comigo, sempre cuidando de tudo, e nunca desiste de mim mesmo quando eu me afasto. E ter essa certeza me faz ir em frente mesmo quando tudo diz para desistir.

Agradeço a minha família, todinha, vó Maria, vô Idênio, Tias Rê, Edi, Vivi e Cris e os agregados; pai Paulo e aos meus irmãos Rafa, Daia (cunhada-irmã) e Patrícia. Em especial agradeço á minha irmã Maria Vitória, meu padastro Alexandre e sobretudo a minha mãe Eliane que tem sempre as palavras certas para cada momento, por acreditarem. Agradeço por me incentivarem e me fazerem acreditar na minha capacidade quando o cansaço me fez duvidar e compreenderem que minha ausência não significa falta de vontade de estar presente ou falta de amor.

Um agradecimento grande e especial para minha orientadora Ana Battastini que é sempre um exemplo de pessoa e profissional, porque sempre confiou em mim e que soube compreender essa fase final fora do planejado.

Agradeço ao professor Jean Sévigny pela oportunidade de realizar meu doutorado sanduíche em seu laboratório na Universidade de Laval, Québec, Canadá. Agradeço mais ainda ao seu auxiliar de pesquisa, Alain Trambley, cuja sabedoria e competência permitiram que eu realizasse em 6 meses o que muitos acreditam ser um mestrado de 2 anos. Agradeço também a auxiliar de pesquisa Julie Peletier, sempre disponível, acessível e simpática em resolver as dúvidas e providenciar os materiais. E agradeço a Joana Lecka que salvou minha vida no primeiro dia no Canadá me mostrando o caminho de casa e do mercado, e as queridas colegas de doutorado Mabrouka e Mariam pelos agradabilíssimos momentos compartilhados.

Ao professor Rafael Roesler pela colaboração nos projetos que permitiram a realização dos experimentos *in vivo*.

Dizem que amigos são a família que a gente escolhe, é com muita alegria que agradeço aos amigos, pelas palavras, pelo incentivo, pelos momentos compartilhados, pelas indiadas e parcerias, conversas ao vivo ou por whatsapp quando o tempo não permitia o encontro, pela compreensão da falta de tempo e ausências, enfim por serem amigos inefáveis cuja presença me faz acreditar que estou no caminho certo da vida! A todos e a cada um:

- Aos colegas e amigos do laboratório 22: Carol, Fabrícia, Fabrício, César, Elisa, Angélica, Anna, Dani, Letícia, Robertinha, Patrícia, Manoela, Fabi. Um salve especial a Fabrícia, Fabrício e Carol pelas ajudas científicas nos experimentos e protocolos além da grande amizade! E as minhas queridas IC's Manoela e Anna.

- As dilcinhas que a faculdade trouxe: Nina, Érica, Dani, Gi, Deni, Ana, Gabi e também a Jéssica. Em especial aquelas que dividem o apartamento e a vida diária, Érica e Nina, faltam palavras! E a minha colega de profissão, Aline.

- As "friends forever": Mi, Morga, Lili e Jori, da infância para vida eu espero ter a amizade de vocês para sempre mesmo, admiro muito cada uma.

- Aos amigos de fé do Acamps, todos são muito importantes, mas agradeço principalmente aos gusgos, dentre eles em especial Kaki e Will; as Acamps girls e a Luiza, Vini, Paty, Pedro e João.

- Aos amigos brasileiros que conheci e foram como uma família no Canadá, em especial: Joelma, Victor, Alexandre, Verônica, Yuri, Ausguto e Marília.

Aos funcionários da Unidade de experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelo auxílio e ótimo serviço.

Por fim, ao CNPq, CAPES, FIPE e UFRGS.

RESUMO

O câncer de bexiga é a segunda neoplasia urogenital mais comum, atinge mais os homens e está relacionado principalmente com o fumo. Os tratamentos atualmente utilizados não são suficientemente efetivos, permitindo os diversos casos de recorrência, progressão do tumor e/ou morte do paciente. Assim, as pesquisas realizadas continuam buscando tratamentos mais efetivos. Diversos estudos revelam o envolvimento do sistema purinérgico na tumorigênese da bexiga, no âmbito das ectonucleotidases, há evidências de alterações em duas delas na progressão do câncer de bexiga: a NTPDase3 e a ecto-5'-NT/CD73. O urotélio normal dos camundongos expressa a NTPDase3 que é expressa em linhagem de câncer de bexiga de grau 1 (RT4), mas não em linhagem de grau 3 (T24). Já a ecto-5'-NT/CD73, não é expressa no urotélio normal de camundongos e tem baixa atividade em linhagem de câncer de bexiga de grau 1 (RT4) em comparação a linhagem de grau 3 (T24), evidenciando a possível participação destas proteínas na progressão do câncer de bexiga. Dessa forma, o objetivo desta tese foi investigar o envolvimento da NTPDase3 e da ecto-5'-NT/CD73 na progressão e malignidade do câncer de bexiga. A fim de caracterizar a expressão dessas enzimas durante a progressão do estabelecimento do câncer de bexiga, camundongos Balb-c receberam N-butil-N-(hidroxibutil)-nitrosamina (BBN) 0,05% em sua água de beber por 4, 8, 12, 18 e 24 semanas. Nas primeiras 8 semanas as bexigas dos animais apresentaram características de inflamação, em 12 semanas iniciaram as transformações neoplásicas que em 24 semanas caracterizaram câncer. A NTPDase3 teve sua expressão diminuída nesse processo, enquanto a ecto-5'-NT/CD73 passou a ser expressa e sua expressão foi significativamente maior no urotélio cancerígeno. A fim de verificar se a atividade das enzimas acompanhava as alterações de expressão, o câncer de bexiga foi induzido pela BBN em ratos Wistar por 24 semanas. As hidrólises de ATP e ADP são maiores nas bexigas dos animais controle do que no urotélio tumoral dos animais concordando com a expressão da NTPDase3. Por fim, no intuito de verificar o envolvimento dessas duas enzimas na malignidade do câncer de bexiga, a NTPDase3 foi superexpressa na linhagem T24, por transfecção com pcDNA3, e a ecto-5'-NT/CD73 foi silenciada utilizando o sistema CRISPR/Cas. Os clones de cada transfecção foram caracterizados mostrando o sucesso de ambas transformações genéticas. As transfecções não alteraram significativamente as respostas purinérgicas testadas e os experimentos de implante tumoral *in vivo* mostram que a ecto-5'-NT/CD73 está provavelmente envolvida na malignidade dessa neoplasia.

ABSTRACT

The bladder cancer is the second most prevalent tumor of genitourinary tract. It is more common among men and it is mainly associated with smoking. The current treatments are not efficient enough to avoid the cases of tumor recurrence, progression and patient death. So, the researches follow the pursuit of more effective treatments. Many studies have shown the involvement of purinergic system in the bladder tumorigenesis, in relation to the ectonucleotidases, there is evidence of the engagement of two of them, the NTPDase3 and the ecto5'-Nucleotidase/CD73. The health urothelium expresses NTPDase3, which is also expressed in a bladder cancer cell line of grade 1 (RT4) but it is not expressed in bladder cancer cell line of grade 3 (T24). While ecto-5'-NT/CD73 does not is expressed in the health urothelium of mice and presents a low activity in a bladder cancer cell line of grade 1 front of a high activity in a bladder cancer cell line of grade 3, highlighting the possible role of these proteins in the bladder cancer progression. In this way, the aim of this thesis was to investigate the involvement of NTPDase3 and ecto-5'-NT/CD73 in bladder cancer progression and malignancy. To investigate the enzymes expression during the progress of bladder cancer establishment, Balb-c mice received 0,05% of N-butyl-N-(hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) in its drinking water during 4, 8, 12, 18 and 24 weeks. Until the first 8 weeks just inflammation was observed in mice bladder, at 12 week beginning the neoplastic alterations that culminated in cancer after 24 weeks of induction. The NTPDase3 expression was decreased in this process while ecto-5'-NT/CD73 showed up and was significantly enhanced in cancerous urothelium. To verify if the enzyme activities were in agreement with their expression changes, bladder cancer was induced in Wistar rats with BBN for 24 weeks. The ATP and ADP hydrolysis was higher in the urothelium of control animals than in the cancerous urothelium, in accordance with NTPDase3 expression. Finally, in order to verify the involvement of these two enzymes in bladder cancer malignancy, NTPDase3 was overexpressed in T24 bladder cancer cell line, through transfection with pcDNA3, and ecto-5'-NT/CD73 was silenced with CRISPR/Cas system. The clones of each transfection were featured showing the success of both cell genetic transformations. The transfections did not significantly change the tested purinergic answers and the experiments of *in vivo* tumor implant shows that ecto-5'-NT/CD73 is probably involved in bladder cancer malignancy.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACS** – “American Cancer Society” (Sociedade Americana do câncer)
- ACRs** – “Apyrase conserved regions” (Regiões conservadas da apirase)
- ADO** – Adenosina
- ADP** – Adenosina difosfato
- AMB** – Associação médica brasileira
- AMP** – Adenosina monofosfato
- APCP** – Alfa,beta-metileno-ADP
- ATP** – Adenosina trifosfato
- BBN** – N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina
- BCG** – Bacilo Calmet Guerin
- CB- MI** – Câncer de bexiga músculo invasivo
- CB- NMI** - Câncer de bexiga não músculo invasivo
- CCT** – Carcinoma de células transicionais
- CDKN2A** - Ciclina dependente de inibidor de kinase
- CIS** – Carcinoma *in situ*
- CRISPR/Cas** – “Short palindromic repeats -associated Cas system” (Sistema de repetições palindrômicas curtas associadas a enzima Cas)
- CT** – Tomografia Computadorizada
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DP** – Desvio padrão
- Ecto-5'-NT/CD73** – Ecto-5'-nucleotidase/CD73
- E-NPPs** - Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases
- ENTPDase** – Ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

EGFR – “epidermal growth factor receptor” (receptor do fator de crescimento epidérmico)

FGFR3 - Receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto

GPPG – Grupo de pesquisa em pós-graduação

HCPA – Hospital de clínicas de Porto Alegre

HE – Hematoxilina e eosina

IARC – “The International Agency for Research on Cancer” (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISUP – Sociedade Internacional de Patologia Urológica

MRI – “Magnetic Resonance Imaging” (Ressonância magnética)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – “Phosphate buffered saline” (Tampão salina fosfato)

PET – “Positron Emission Tomography” (Tomografia por emissão de pósitrons)

PFA – Tampão PBS contendo soro fetal bovino e azida.

Pi – Fosfato inorgânico

PTEN – Fosfatase homóloga à tensina

P1 – Receptores purinérgicos responsivos à adenosina

P2 – Receptores purinérgicos responsivos a nucleotídeos di e tri fosfatados

RB1 – Retinoblastoma 1

RT – Ressecção Transuretral

SFB – Soro Fetal Bovino

TMS – Tampão TRIS-maleato-sacarose

TNM – Tumor-Nódulo-Metástase

TRAIL - “tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand” (ligante indutor de apoptose relacionado à necrose tumoral)

UEA – Unidade de experimentação animal

UICC - União Internacional contra o câncer

18-FDG - 2-deoxi-2-[¹⁸F]flúor-D-glicose

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 O câncer de bexiga	2
1.1.1 Generalidades.....	2
1.1.2 Tipos de câncer de bexiga	4
1.1.3 Sintomas e Diagnóstico.....	6
1.1.4 Classificação	7
1.1.5 Tratamento.....	10
1.1.6 Alterações gênicas.....	12
1.2 Modelos experimentais de câncer de bexiga em roedores.....	15
1.2.1 Modelo de indução do câncer de bexiga com <i>N</i> -butil- <i>N</i> -(4-hidroxibutil)-nitrosamina em camundongos	15
1.2.2 Modelo de implante de tumor xenográfico em camundongos imunossuprimidos (<i>nude mice</i>).....	16
1.3 Sistema purinérgico	16
1.3.1 As <i>NTPDases</i> / <i>NTPDase3</i>	18
1.3.2 A <i>ecto-5`-nucleotidase</i>	20
1.3.3 O sistema purinérgico e o reflexo de micturação	22
1.4 A relação entre o câncer de bexiga e o sistema purinérgico	23
2. OBJETIVO.....	25
2.1 Objetivos específicos.....	25
3. CAPÍTULO I	26
4. CAPÍTULO II	38
5. CAPÍTULO III.....	54
6. DISCUSSÃO	87
7. CONCLUSÕES	102

8. PERSPECTIVAS.....	103
9. REFERÊNCIAS	104

APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada em seções organizadas da seguinte maneira: Introdução, Resultados, Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

Na Introdução são apresentados os temas estudados, a fundamentação teórica que nos levou ao desenvolvimento deste trabalho e os focos de estudo, descritos no item Objetivos.

A seção de Resultados está dividida em três capítulos de acordo com os diferentes focos de estudo. Em cada capítulo estão descritos os materiais e métodos utilizados bem como os resultados obtidos, sendo o primeiro capítulo artigo científico publicado. A maior parte do trabalho foi realizada na UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do sul, Brasil; somente as transfecções (capítulo 3) foram realizadas durante o Doutorado sanduíche na Universidade de Laval, Québec, Québec, Canadá.

A Discussão contém a argumentação bibliograficamente embasada da interpretação e da importância dos resultados obtidos nos três capítulos.

A seção Conclusões aborda as hipóteses concluídas na tese.

Nas perspectivas estão elucidados os próximos passos para que os Capítulos 2 e 3 sejam complementados e publicados na forma de artigo científico, bem como as novas abordagens suscitadas pela tese que podem ser investigadas a fim de corroborar com a linha de estudo.

A seção Referências Bibliográficas lista as referências utilizadas na redação da tese, exceto Capítulo 1 que tem sua própria lista de referências.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer de bexiga

1.1.1 Generalidades

O câncer de bexiga é o nono câncer mais comum no mundo, sendo o sétimo que mais frequentemente acomete os homens, o décimo primeiro em diagnóstico e o décimo quarto em mortes (“Globocan 2012”, [s.d.]; MAHDAVIFAR et al., 2016). Em 2015, foram 468.351 novos casos no mundo dos quais 360.875 eram homens e 107.476 mulheres, sendo 179.753 o número dos casos que resultaram na morte do paciente (“Globocan 2012”, [s.d.]). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer estão previstos 9.670 novos casos para 2016, sendo 7.200 homens e que resultarão em 3.642 mortes (“INCA, 2016”, [s.d.]).

O câncer é uma doença multifatorial cujo desenvolvimento vai ser determinado tanto por características do indivíduo bem como seus hábitos e ambiente. Cada tipo de câncer tem seu conjunto de fatores que aumentam seu risco de ocorrência, alguns destes podem ser evitados, como fumo, e outros não, como é o caso da idade e histórico familiar. Os fatores de risco para o surgimento do câncer de bexiga são:

Dos fatores que podem ser evitados ou mudados:

- *Fumo*: é o principal fator de risco sendo responsável por 50% dos cânceres de bexiga e 65% dos invasivos (KLOTZ; BRAUSI, 2015). O aumento de triptofano na urina, como resultado da metabolização “do fumo”, parece ser o responsável pela transformação neoplásica (CHUNG; GADUPUDI, 2011);

- *Exposição Ocupacional*: A exposição a aminas aromáticas como a benzidina e a beta-naftalina usadas em fábricas de corante, bem como compostos

químicos orgânicos utilizados nas indústrias de borracha, de couro, têxtil e gráfica também aumenta a incidência do câncer de bexiga, o que justifica o aumento dos casos com o aumento da industrialização (“American Cancer Society”, [s.d.]; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010; WALLACE, 1988);

- *Diabetes Tipo 2*: o risco aumentado para pacientes com Diabetes Tipo 2 está vinculado ao uso de antidiabéticos da classe das tiozolidinedionas como a Rosiglitazona e Pioglitazona (“American Cancer Society”, [s.d.]; HAN et al., 2016) que por isso tem sido retiradas do mercado ou indicadas com venda restrita;

Dos fatores que não podem ser evitados ou mudados:

- *Idade*: O risco de desenvolver câncer de bexiga aumenta com o aumento da idade (“American Cancer Society”, [s.d.]; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010). Em 2015, dos 468.351 novos casos mundiais 66,5 % (311.382) eram de pessoas com idade maior ou igual a 65 anos (“Globocan 2012”, [s.d.]). Já no Brasil, dos 10.885 novos casos 70,9 % (7.713) eram de pessoas com idade maior ou igual a 65 anos (“Globocan 2012”, [s.d.]);

- *Sexo*: O câncer de bexiga acomete mais os homens do que as mulheres (“Globocan 2012”, [s.d.]; MALATS; REAL, 2015);

- *Exposição maciça em longo prazo à ciclofosfamida*, um agente alquilante imunossupressor usado no tratamento de diversos tumores sólidos e doenças autoimunes que também induz cistite hemorrágica. Os efeitos tóxicos da ciclofosfamida são atribuídos a formação do metabólito acroleína (BOEIRA et al., 2011; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010);

- *Infecção ou irritação crônica*: Episódios de irritação crônica da bexiga, como o uso de cateteres ou pedra na bexiga, aumentam o risco de carcinoma de células escamosas (“American Cancer Society”, [s.d.], “Diretrizes AMB”, 2016;

JACOBS; LEE; MONTIE, 2010). Infecção pelo *Schistosoma haematobium* também aumenta a possibilidade do desenvolvimento deste tipo de carcinoma que surge em meio à inflamação crônica causada pelo parasita (“American Cancer Society”, [s.d.], “Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010).

- *Histórico pessoal de carcinoma urotelial*: ter um carcinoma urotelial no trato urinário, seja na bexiga, rim, ureteres ou uretra, aumenta o risco de desenvolver um novo câncer na mesma área ou em outra parte do trato urinário (“American Cancer Society”, [s.d.]);

- *Histórico familiar*: Pessoas que tem familiares que tem ou tiveram câncer de bexiga tem risco aumentado de desenvolver a doença. Isso pode ocorrer porque os membros da família estão expostos ao mesmo agente carcinogênico (é o caso do tabaco), ou por compartilharem alterações genéticas (“American Cancer Society”, [s.d.]).

1.1.2 Tipos de câncer de bexiga

A bexiga tem quatro camadas: urotélio, lâmina própria, músculo e gordura perivisceral e a denominação do tipo de câncer vai ser de acordo com a sua origem:

- *Carcinoma urotelial*: também conhecido como carcinoma de células transicionais (CCT), são as neoplasias oriundas das células transicionais que constituem o urotélio. É o tipo mais comum de câncer de bexiga representando 90% dos casos (JUNIOR, N.R.N, 1999; MA et al., 2006). De acordo com a figura 1, os carcinomas podem ser papilares ou planos, não invasivos ou invasivos, sendo os não invasivos precursores dos invasivos;

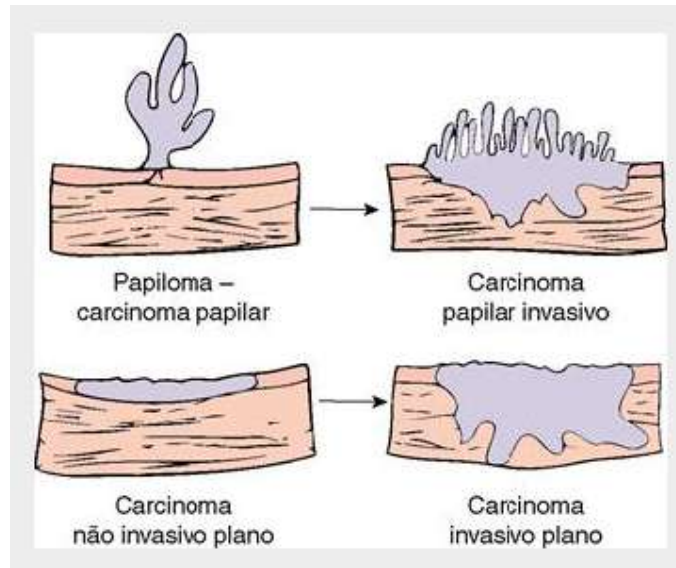


Figura 1. Diferentes tipos de carcinoma de células trasicionais: carcinoma papilar e carcinoma plano não invasivos e seus derivados de maior malignidade, os carcinomas papilares e planos invasivos (KUMAR, ABBAS E ASTER, 2013).

- Carcinoma de células escamosas: Tem origem nas células delgadas e planas que surgem no urotélio depois de infecção ou irritação prolongada (“INCA, 2016”, [s.d.]). Nos Estados Unidos, os casos de carcinoma de células escamosas representam somente 1 a 2% dos casos de câncer de bexiga (“American Cancer Society”, [s.d.]);

- Adenocarcinoma: Tem origem nas células glandulares que podem surgir na bexiga depois de longos períodos de infecção ou irritação (“INCA, 2016”, [s.d.]). Correspondem a apenas 1% dos casos dos quais a maioria são tumores invasivos (“American Cancer Society”, [s.d.]);

- Sarcoma: Os tumores de origem mesenquimal (músculo) são raros, correspondendo a apenas 1 a 5% dos tumores de bexiga (“American Cancer Society”, [s.d.]; JUNIOR, N.R.N, 1999).

1.1.3 Sintomas e Diagnóstico

A sintomatologia mais freqüente é hematúria indolor micro ou macroscópica (“Diretrizes AMB”, 2016; KUMAR, ABBAS E ASTER, 2013). Ela pode ser o único sintoma ou ser acompanhada de irritabilidade vesical, a qual é caracterizada por disúria, poliaciúria (“Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010).

A hematúria intensa pode tornar a urina rosa ou vermelha. Contudo, a liberação de pequenas quantidades de sangue na urina causada por quadros inflamatórios e tumores iniciais pode ser diagnosticada através de uroanálise, realizada durante os exames de “checkup” (“American Cancer Society”, [s.d.]).

As técnicas utilizadas para o diagnóstico do câncer de bexiga são: cistoscopia, citologia, ultra-sonografia, tomografia computadorizada (CT), ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada (PET/CT) e ressecção transuretral (RT) (“Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010).

A cistoscopia é utilizada para diagnóstico e acompanhamento após terapêutica, causa desconforto mínimo e é bem tolerada, mas apresenta dificuldade de detectar lesões pequenas ou planas como carcinoma *in situ* (CIS) levando a ressecção incompleta e altas taxas de recorrência; a citologia urinária também é utilizada para diagnóstico e acompanhamento do paciente após o tratamento, tem baixa sensibilidade (35%) para tumores de baixo grau, porém alta especificidade (84%); a ultra-sonografia detecta tumores maiores que 0,5 cm, sendo utilizada pelo seu baixo custo e por não ser invasiva; CT e MRI são usadas para diferenciar lesões invasivas de não invasivas, isto é, determinar a extensão local do tumor e a existência de metástases intra-abdominais. Contudo, a CT e MRI não são capazes de detectar metástases iniciais, particularmente em linfonodos de tamanho normal,

para isso pode-se utilizar a PET com 2-deoxi-2-[¹⁸F]flúor-D-glicose (18-FDG). A técnica PET/CT permite a localização dos achados funcionais (detectados com PET) nas estruturas anatómicas (mostradas em CT). A ressecção transuretral é utilizada para diagnóstico definitivo, estadiamento e tratamento (“Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010).

1.1.4 Classificação

A padronização da classificação do tumor é importante para padronização dos tratamentos. A mais utilizada atualmente é a da União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominada TNM (tumor-nodo-metástase) onde T corresponde a extensão clínica do tumor primário, isto é, de acordo com a sua invasividade nas diferentes camadas da bexiga (figura 2); N ao envolvimento de linfonodos; e M à presença de metástases (“Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010; KNOWLES; HURST, 2015).

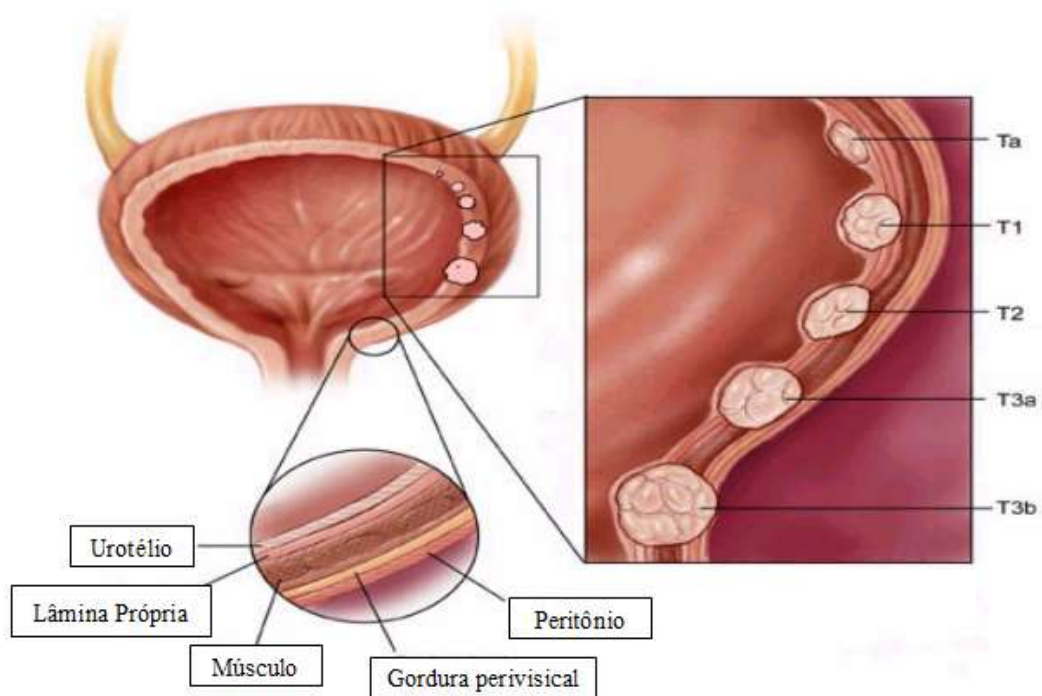


Figura 2. Camadas da bexiga e classificação tumoral: Ilustração das camadas da bexiga e de tumores de diferentes graus de acordo com a sua invasividade nas mesmas, conforme a Tabela 1. Adaptado de “DaHora Online”, 2016.

Tabela 1. Classificação dos tumores de bexiga segundo o sistema TNM.

T (Tumor primário)
Tis – Carcinoma in situ
Ta – Carcinoma papilífero restrito a mucosa
T1 – Invasão da lâmina própria
T2 – Invasão da musculatura superficial
T3a – Invasão da musculatura profunda
T3b – Invasão da gordura perivisceral
T4 – Invasão de órgãos adjacentes e vísceras pélvicas
T4a – Invasão da próstata, vagina ou útero
T4b – Invasão da parede pélvica ou abdominal
T0 – Ausência de tumor
Tx – Extensão tumoral não esclarecida
N (linfonodos)
N0 – Ausência de linfonodos comprometidos
N1 – Linfonodo único unilateral menor ou igual a 2cm de diâmetro
N2 – Linfonodo único entre 2 e 5 cm ou vários menores que 5 cm de diâmetro
N3 – Linfonodos maiores que 5 cm
N4 – Envolvimento dos linfonodos periaórticos
Nx – Linfonodos não estudados
M (metástase)
M0 – Ausência de metástase a distância
M1 – Presença de metástase a distância
Mx – Presença de metástases não avaliadas

Além do estadiamento, o tumor é também classificado quanto à graduação histológica. No Brasil, segue-se o consenso entre a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP), conforme a figura 3 (“Diretrizes AMB”, 2016).

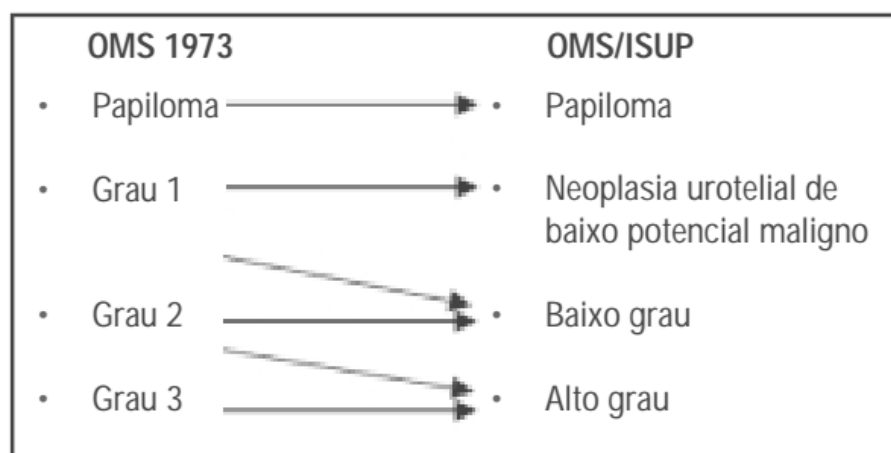


Figura 3. Classificação histológica do câncer de bexiga, segundo o consenso OMS/ ISUP de 1998 que tem melhor correlação clínico-histológica (Diretrizes AMB 2016).

1.1.5 Tratamento

O tratamento do câncer de bexiga é determinado pelo estadiamento do tumor. Para os cânceres de bexiga não músculo invasivos (CB-NMI), superficiais e T1, o tratamento de escolha é a ressecção transuretral seguida de imuno, radio ou quimioterapia (“American Cancer Society”, [s.d.], “Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010; KUMAR, ABBAS E ASTER, 2013). Uma primeira RT é realizada para diagnóstico, o objetivo da ressecção como tratamento é a retirada total do tumor que deve incluir uma porção de músculo (“American Cancer Society”, [s.d.], “Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010; KUMAR, ABBAS E ASTER, 2013). A imuno e/ou quimioterapia adjuvantes são empregadas para

diminuir ou retardar os casos de recorrência e progressão tumoral, isto é, combater possíveis focos tumorais remanescentes. Nesse sentido, o tratamento que tem demonstrado maior eficácia é a RT seguida de instilação intravesical do Bacilo de Calmette-Guérin (imunoterapia com BCG), o qual provoca uma reação granulomatosa típica que promove uma resposta imune antitumoral local eficaz (KUMAR, ABBAS E ASTER, 2013). Apesar desse ser o tratamento mais eficaz, 20 a 40% dos pacientes apresentam recorrência tumoral (“American Cancer Society”, [s.d.], “Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010; SCHWARZER et al., 2010).

Já o tratamento dos casos de câncer de bexiga músculo invasivo (CB-MI) consiste em cistectomia radical ou radioterapia seguidas de quimioterapia (“Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010). A cistectomia radical consiste na retirada total da bexiga através de procedimento cirúrgico, é o tratamento mais usual para os tumores de alto grau de malignidade e não deve ser postergada a fim de evitar a progressão tumoral e o surgimento de metástases (“American Cancer Society”, [s.d.]; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010). Pacientes que não optam ou não estão aptos a cistectomia radical são tratados com radioterapia e quimioterapia adjuvante (“American Cancer Society”, [s.d.]; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010). Diversos estudos têm demonstrado a eficácia deste tipo de estratégia terapêutica, incluindo sua comparação com a cistectomia radical, uma vez que essa estratégia é menos invasiva e preserva a bexiga (BYUN et al., 2015; DEMIRCI et al., 2015; KOTWAL et al., 2008).

Após o tratamento os pacientes são monitorados continuamente, através principalmente de cistoscopia e citologia urinária, para verificação de recorrência.

Os casos de câncer avançado, em que o paciente apresenta metástases no momento do diagnóstico, são tratados com quimioterapia que é apenas paliativa (“American Cancer Society”, [s.d.]; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010)

1.1.6 Alterações gênicas

A frequência de mutações somáticas em CB-MI (câncer de bexiga músculo invasivo) é aproximadamente 300 mutações exônicas por amostra, com uma média de 7,7 por megabase e dominada por transições C:G→T:A. Esta frequência que é superada apenas por câncer de pulmão e melanoma (KNOWLES; HURST, 2015).

Das alterações genéticas que acabam ocasionando o fenótipo maligno das células cancerígenas, já foi mostrado que mutações no gene p53 são as mais comuns no câncer de bexiga e estão associadas com a progressão tumoral, 76% dos CB-MI apresentam p53 inativa (KNOWLES; HURST, 2015; KUMAR, ABBAS E ASTER, 2013; MA et al., 2006). O gene p53 está envolvido na regulação do ciclo celular, apoptose e reparação do DNA em vários tipos celulares.

A deleção de ambos os braços do cromossomo 9 (9p-/9q-) é uma característica comum entre CB-NMI e CB-MI, etapa inicial comum que afeta genes supressores tumorais como, e principalmente, a deleção de ciclina dependente de inibidor de kinase (CDKN2A), que codifica p14 e p16 que tem papel na regulação do ciclo celular (KNOWLES; HURST, 2015; KUMAR, ABBAS E ASTER, 2013; WU, 2005).

Enquanto alterações em p14 e p16 são comuns aos casos de CB-NMI e MI e alterações em p53 e RB1 (retinoblastoma 1) aparecem mais frequentemente em CB-MI, alterações em FGFR3 (receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto) e RAS (HRAS E KHAS) aparecem mais frequentemente em CB-NMI (KNOWLES; HURST,

2015). O FGFR3 mutante ativa a via RAS-MAPK e a fosfolipase- γ aumentando a sobrevivência e a proliferação das células e está presente em até 80% dos carcinomas papilares não invasivos (KNOWLES; HURST, 2015).

As alterações gênicas descritas acima estão de acordo com a proposta de Wu et al., 2005 na qual estudos clínicos mostram que carcinomas uroteliais podem surgir por, pelo menos, duas vias distintas, conforme mostrado na figura 4. Este comportamento diverge da maioria dos tumores epiteliais que progridem de benigno para maligno ao longo de uma via única, isto é, através de mutações sucessivas em genes chave que regulam crescimento, sobrevivência, apoptose e as interações célula-célula.

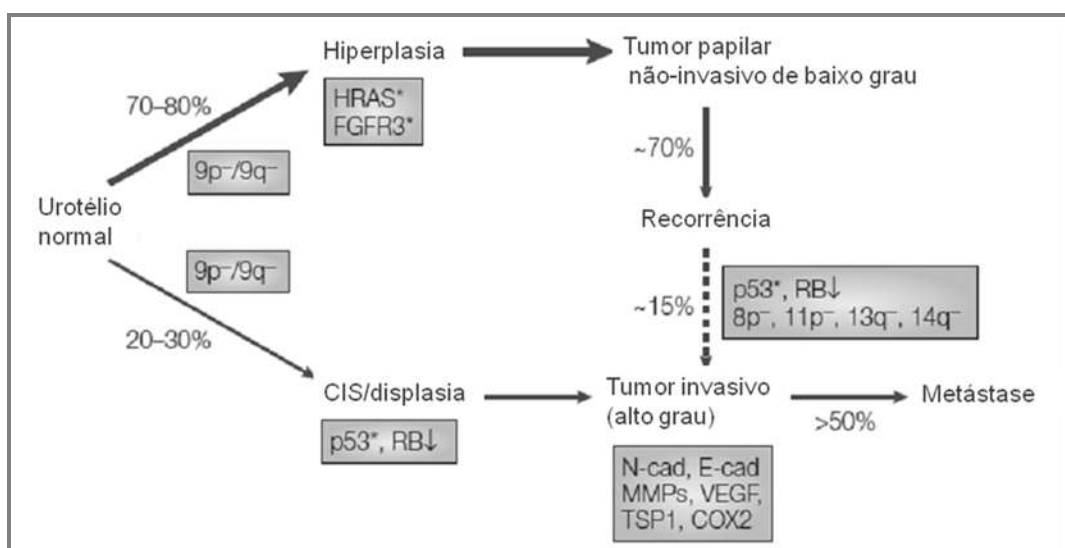


Figura 4: Importantes defeitos genéticos e epigenéticos que caracterizam as vias divergentes da tumorigênese urotelial. Dados clínicos e evidências experimentais indicam que os tumores uroteliais surgem e progridem ao longo de duas vias distintas. A primeira delas (superior) representa 70% a 80% dos tumores uroteliais, é geralmente precedida por hiperplasia papilar simples e exibe uma morfologia tumoral de baixo grau, superficial e papilar. Cerca de 70% desses tumores irão recorrer, mas somente 15% irão progredir e infiltrar a musculatura (linha tracejada). Estes tumores partem frequentemente de mutações no gene HRAS

(30% a 40%) e no gene do receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR3) (aproximadamente 70%), indicando que a ativação do receptor tirosina quinase de RAS (RTK-Ras), que está constitutivamente ativo em carcinomas uroteliais, tem um papel inicial crucial nesta via. Deleções nos braços curtos dos cromossomos 8 e 11 (8p- e 11p-) e nos braços longos dos cromossomos 13 e 14 (13p- e 14p-) estão geralmente associadas com a progressão tumoral e estágios invasivos. A segunda via tumoral (inferior) (representa 20% a 30% dos tumores uroteliais) é caracterizada por tumores músculo-invasivos de alto grau que podem ser provenientes de carcinoma in situ, displasia severa ou de origem direta. Mais da metade desses tumores contém defeitos funcionais e estruturais nos genes supressores tumorais p53 e/ou na proteína retinoblastoma (RB), e 50% deles progredem para metástases locais ou distantes apesar da cistectomia radical e quimioterapia. Invasão tecidual e metástases são promovidas por diversos fatores que alteram o microambiente tumoral, incluindo a expressão aberrante de N- e E-caderinas, metaloproteinases de matriz (MMPs), fatores angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e fatores antiangiogênicos como trombospondina 1 (TSP1) e cicloxigenase 2 (COX2). Deleção em ambos os braços do cromossomo 9 (9p-/9q-) ocorre inicialmente na tumorigênese urotelial, mas não são marcadores que diferenciam as duas vias tumorais. Os asteriscos indicam proteínas mutadas. Adaptado de Wu, 2005.

O gene *PTEN* (fosfatase homóloga a tensina) é responsável por inibir a migração celular, suprimir a proliferação celular e apoptose, e fazer a manutenção da integridade do genoma. Estudos utilizando análise de tecido por *microarray* e imunistoquímica têm mostrado que a expressão de PTEN está diminuída em tumores de bexiga de alto grau de malignidade (KNOWLES; HURST, 2015; YOHN et al., 2011). Alteração de PTEN está associada à alteração em TP53 (fator de transcrição de p53) e mau prognóstico (KNOWLES; HURST, 2015).

Gui e colaboradores realizaram um estudo com amostras de 51 indivíduos com carcinoma de células transicionais não músculo invasivo (NMI-TCC) e 37 de

carcinoma de células transicionais músculo-invasivo (MI-TCC). Neste estudo eles confirmaram mutações significativas em cinco genes já descritos: p53, RB1, HRAS, FGFR3 e KRAS, e identificaram outros 49 genes significativamente mutados, dentre os quais oito genes envolvidos no remodelamento da cromatina, são eles: UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1 e MLL3. Além disso, mostraram que UTX foi substancialmente alterado mais frequentemente em tumores de baixo grau de malignidade, o que lhe atribuiria um papel potencial na classificação e diagnóstico do câncer de bexiga (GUI et al., 2011).

1.2 Modelos experimentais de câncer de bexiga em roedores

1.2.1 Modelo de indução do câncer de bexiga com N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina em camundongos

A N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN) é um representante de uma importante classe de compostos carcinogênicos humanos: as nitrosaminas, e sua carcinogenicidade é limitada ao urotélio. O tumor de bexiga induzido pela adição de BBN 0,05% na água de beber de roedores corresponde às características histopatológicas do principal tipo de tumor a atingir o homem: o de células transicionais (CHEN et al., 2009; WILLIAMS; LEE; THEODORESCU, 2008). Além das semelhanças no que diz respeito às características histopatológicas, o modelo de indução carcinogênica também divide similaridades genéticas em vias relevantes para o desenvolvimento do tumor músculo invasivo em humanos (WILLIAMS; LEE; THEODORESCU, 2008). O tempo de indução do câncer de bexiga pela BBN em camundongos e ratos varia de 8 a 24 semanas (PARADA et al., 2009, 2011; SERENO et al., 2010, ROCKENBACH et al., 2014).

1.2.2 Modelo de implante de tumor xenográfico em camundongos imunossuprimidos (*nude mice*)

A linhagem de câncer de bexiga com a qual o nosso grupo de pesquisa trabalha é de origem humana e por isso não permite o uso de modelo de implante ortotópico, no qual a linhagem celular da mesma espécie é implantada no tecido animal correspondente. Dessa forma, para possibilitar o estudo de crescimento tumoral destas células *in vivo* faz-se necessário o uso do modelo de implante de tumor xenográfico no qual as células suspensas em veículo apropriado (meio de cultura com ou sem adição de matrigel) são injetadas no flanco dorsal de camundongos imunossuprimidos (*nude*). Os animais *nude* têm seu sistema imune suprimido, permitindo o desenvolvimento do tumor de células de espécie diferente sem o combate pelo sistema imune.

1.3 Sistema purinérgico

As purinas e pirimidinas extracelulares são moléculas sinalizadoras que apresentam diversos efeitos sobre muitos processos biológicos, incluindo neurotransmissão, contração muscular, secreção, resposta imunológica, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação da função cardíaca, ciclo, diferenciação e morte celular, entre outros (BURNSTOCK, 2004; SHABBIR; BURNSTOCK, 2009). Os eventos induzidos por nucleotídeos extracelulares ocorrem via purinoreceptores e são controlados pela ação de ecto-enzimas.

Os purinoreceptores são divididos em duas classes: P1 e P2 (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os receptores P1 são sensíveis à adenosina, sendo subdivididos em A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃, todos acoplados à proteína G, estão ligados a vias de sinalização intracelulares que desempenham importantes papéis na

sobrevivência das células (ZIMMERMANN, 2006). Os receptores do tipo P2 têm grande preferência por nucleosídeos di- e trifosfatados, como ATP e ADP (adenosina tri- e difosfato), e são subdivididos em P2X (ionotrópicos) e P2Y (metabotrópicos) (WHITE; BURNSTOCK, 2006). São conhecidos sete subtipos de receptores P2X (P2X_{1,2,3,4,5,6} e 7) cujo principal ligante é o ATP, e oito subtipos de receptores P2Y (P2X_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14}) que são sensibilizados por ATP, ADP e mais alguns nucleotídeos (FERRARI et al., 2015; WHITE; BURNSTOCK, 2006).

As ectonucleotidases são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos até seus respectivos nucleosídeos, constituindo uma cascata enzimática altamente eficiente, são responsáveis pelo controle da concentração e do tempo em que essas moléculas sinalizadoras permanecem no meio extracelular estimulando seus receptores (ZIMMERMANN, 2000). Essas enzimas podem variar consideravelmente sobre diversos aspectos, mas todas elas apresentam 5 sequências conservadas, denominadas de “regiões conservadas da apirase” (ACRs). É devido à presença das ACRs que há semelhança dessas enzimas em suas atividades catalíticas (ZIMMERMANN, 2000). Além disso, elas fazem uso de cátions divalentes como Ca²⁺ ou Mg²⁺ e pH alcalino (7,5 – 8,0) para atingirem sua atividade máxima (YEGUTKIN, 2008).

A família das ectonucleotidases é composta pelas E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases), ecto-fosfatases alcalinas e pela ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT/CD73) (YEGUTKIN, 2008). Um trabalho prévio do nosso grupo mostrou que nas nossas condições de ensaio e linhagens de câncer de bexiga humanas utilizadas (T24 e RT4) apenas as seguintes enzimas purinérgicas estão envolvidas

na cascata de hidrólise extracelular do ATP (figura 5): NTPDase3 e ecto-5'-NT/CD73 (STELLA et al., 2010).

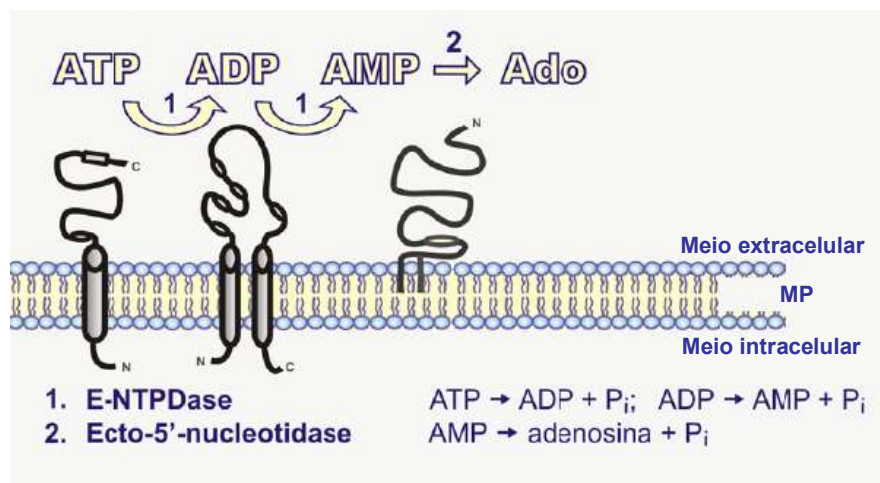


Figura 5. Sistema de hidrólise dos nucleotídeos da adenina estudado no câncer de bexiga. O ATP e o ADP são hidrolisados por E-NTPDases gerando AMP, que por fim é hidrolisado até adenosina pela ação da ecto-5'-nucleotidase (Adaptado de Yegutkin, 2008).

1.3.1 As NTPDases/ NTPDase3

As E-NTPDases são ectonucleotidasas que hidrolisam nucleosídeos di- e trifosfatados. São conhecidos oito membros dessa família, as NTPDases 1-8 que se diferenciam pela localização e especificidade para os substratos (ATP, ADP, UTP e UDP) (AL-RASHIDA; IQBAL, 2014; ZIMMERMANN, 2006).

As NTPDases 1-3 e 8 se encontram ancoradas na membrana plasmática por dois domínios hidrofóbicos e têm o sítio catalítico voltado para o meio extracelular, já as demais, NTPDases 4-7, apresentam-se associadas a organelas intracelulares (AL-RASHIDA; IQBAL, 2014). A NTPDase1 (CD39) hidrolisa o ATP praticamente direto a AMP, sem acúmulo de ADP; A NTPDase 2 hidrolisa muito mais o ATP do

que ADP, acumulando ADP transitoriamente; As NTPDases 3 e 8 também apresentam uma taxa de hidrólise de ATP maior que de ADP, com uma razão de hidrólise ATP:ADP intermediária entre as NTPDases 1 e 2 (AL-RASHIDA; IQBAL, 2014).

Um importante estudo com bexiga de camundongos mostrou que neste tecido há expressão das NTPDases 1, 2 e 3. A NTPDase1 é expressa no músculo detrusor e nos vasos sanguíneos. A NTPDase2 é expressa por células da lâmina própria e células que rodeiam e se intercalam entre os feixes musculares e a NTPDase 3 é a única expressa no urotélio (YU; ROBSON; HILL, 2011). Esta informação concorda com os dados que mostram que a NTPDase3 é a única NTPDase de membrana plasmática expressa na linhagem humana de carcinoma de bexiga de grau 1, RT4 e não é expressa em uma linhagem também humana de grau 3, T24 (STELLA et al., 2010).

Na bexiga, a NTPDase3 expressa pelas células uroteliais basais e não pelas células “umbrella”, está envolvida na sinalização autócrina e parácrina do ATP e explica diferente cinética do ATP nas superfícies luminal e serosa desta camada (YU; ROBSON; HILL, 2011). A NTPDase3 é também expressa em células hipotalâmicas e pituitárias (HE et al., 2005), linfócitos (VUADEN et al., 2007), no plasma humano (JIANG et al., 2014), astrócitos (BRISEVAC et al., 2013) e regula a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas (SYED et al., 2013). Além do que já foi descrito por Stella et al., 2010, até o presente trabalho não há outras evidências do envolvimento da NTPDase3 com câncer.

1.3.2 A ecto-5`-nucleotidase

A ecto-5'-NT/CD73 se encontra ancorada à membrana plasmática por resíduo C-terminal de glicosilfosfatidilinositol (GPI), e é a ectonucleotidase responsável pela hidrólise de nucleosídeos monofosfatados, principalmente AMP a adenosina, sendo a principal fonte de adenosina no meio extracelular (ZIMMERMANN, 1992, 2000, 2006). Na membrana plasmática esta enzima está co-localizada com os microdomínios de membrana (BIANCHI; SPYCHALA, 2003) e também pode ser encontrada em sua forma solúvel no citosol ou no meio extracelular (resultado da hidrólise da ligação GPI que a ancora à membrana por ação de fosfolipase C e D GPI específicas) (AL-RASHIDA; IQBAL, 2014). Ela apresenta máxima atividade catalítica na presença de Mg^{2+} , além de ser considerada uma metalo-enzima já que apresenta átomos de zinco, e outros metais divalentes, fortemente ligados à sua estrutura. Os nucleotídeos ATP, ADP e o APCP (adenosina 5`-[α , β - metileno difosfato]) são inibidores competitivos altamente eficientes dessa enzima (ZIMMERMANN, 1992, 2000, 2006)

A ecto-5'-NT/CD73 é também denominada como CD73 por ser altamente expressa por linfócitos B e T, constituindo um marcador de maturação para essas células (YEGUTKIN, 2008).

Esta enzima é expressa em uma variedade de tecidos, com expressão abundante no colon, coração, pulmão, cérebro, rim e fígado onde seu papel fisiológico principal parece ser a regulação da cascata de sinalização purinérgica (YEGUTKIN, 2008), gerando adenosina que possui uma variedade de funções fisiológicas como vasodilatação, inibição da liberação de neurotransmissores, inibição das respostas imune e inflamatória, relaxamento do músculo liso (SPYCHALA, 2000; YU et al., 2006).

1.3.2.1 Ecto-5'-NT/CD73 e câncer

A ecto-5'-NT/CD73 é altamente expressa na maioria dos tumores sólidos sendo que seu nível de expressão está associado com a neovascularização, invasividade e metástases (SPYCHALA, 2000; STAGG et al., 2010; ZHANG, 2012; ZHI et al., 2007). O aumento da sua expressão foi descrito para diversos cânceres e o nível de sua atividade enzimática demonstra uma elevada correlação com a localização e o grau do tumor (SPYCHALA, 2000). Por exemplo, o aumento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 indica maior grau de invasividade e capacidade metastática em melanomas e tumores de mama (SADEJ; SPYCHALA; SKLADANOWSKI, 2006; WANG et al., 2008), tem valor de prognóstico para pacientes com câncer de cólon e tem sido sugerida como diagnóstico de apoio em carcinomas papilares de tireóide (ZHANG, 2012).

Além disso, a ecto-5'-NT/CD73 apresenta outras funções independentes da sua atividade enzimática, estando envolvida nas interações célula-célula e célula matriz, adesão e migração celular (WANG et al., 2008; ZHANG, 2012; ZHOU et al., 2007) bem nos mecanismos de resistência a drogas (UJHÁZY et al., 1996). Assim, seu papel na promoção do crescimento tumoral e de metástases parece envolver tanto sua função enzimática como de proteína de adesão.

Ligado a sua atividade enzimática e a ativação dos receptores A_{2A} esta proteína tem demonstrado papel imunossupressor, participando do mecanismo de escape do tumor à resposta imune (ZHANG, 2012).

Dessa forma, essa proteína tem sido bastante estudada e descrita como uma molécula importante na progressão do câncer, demonstrando envolvimento no controle do crescimento celular, maturação, diferenciação, promoção tumoral

incluindo a promoção dos processos de adesão, migração, invasão e metástases (BAVARESCO et al., 2008; SPYCHALA, 2000; WANG et al., 2008; ZHANG, 2012).

Contudo, apesar da intensa descrição desta enzima como fator de malignidade para diversos tipos de câncer, os resultados da alteração da sua expressão e atividade devem ser investigados de acordo com cada tipo de câncer e tratamento uma vez que trabalhos mostram a ligação desta enzima com prognóstico favorável de meduloblastomas (CAPPELLARI et al., 2012) e de pacientes com CB-NMI (WETTSTEIN et al., 2015). E ainda porque foi demonstrado o aumento da sua expressão com a diminuição de linfócitos pró-tumorais em glioma (FIGUEIRÓ et al., 2016).

1.3.3 O sistema purinérgico e o reflexo de micção

Na bexiga, o sistema purinérgico tem um papel essencial: a contração e o relaxamento muscular durante os ciclos miccionais, já demonstrado em camundongos (YU; ROBSON; HILL, 2011). Para iniciar a micção os nervos parassimpáticos liberam ATP estimulando a contração do músculo liso da bexiga via receptor P2X₁. A NTPDase1 converte rapidamente o ATP a AMP que é então hidrolisado a adenosina pela ecto-5'-NT/CD73 cessando o efeito do ATP sobre os receptores P2X₁ e facilitando o relaxamento muscular via receptores A_{2B} da adenosina. Assim, o ATP é considerado um “efetor duplo” porque é responsável tanto pela fase de contração quanto via NTPDase1/ecto-5'-NT/CD73 pela fase de relaxamento muscular do reflexo de micção (YU; ROBSON; HILL, 2011).

1.4 A relação entre o câncer de bexiga e o sistema purinérgico

Os tratamentos atualmente utilizados para combater o câncer de bexiga não são suficientemente efetivos, permitindo os diversos casos de recorrência, progressão do tumor e/ou morte do paciente (“Diretrizes AMB”, 2016; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010; SCHWARZER et al., 2010). Além disso, muitos tratamentos apresentam diversos efeitos adversos porque atingem também as células saudáveis. Nesse sentido, vale lembrar que o câncer surge de uma célula normal que sofreu diversas transformações adquirindo características de resistência à morte e alta taxa proliferativa, de forma que, proteínas ou rotas alteradas que diferem entre as células saudáveis e as do câncer são alvos terapêuticos promissores, cuja identificação é de extrema importância. Somado a isso, diversos estudos têm revelado o envolvimento do sistema purinérgico na tumorigênese da bexiga (BURNSTOCK, 2011; SHABBIR; BURNSTOCK, 2009).

No âmbito das ectonucleotidases, há evidências de alterações em duas delas na progressão do câncer de bexiga: a NTPDase3 e a ecto-5'-NT/CD73. O urotélio normal dos camundongos expressa a NTPDase3 (YU; ROBSON; HILL, 2011), que é expressa em linhagem de câncer de bexiga de grau 1 (RT4), representativo de um tumor menos invasivo, mas não em linhagem de grau 3 (T24), representativo de um tumor mais maligno (STELLA et al., 2010). Já a ecto-5'-NT/CD73, não é expressa no urotélio normal de camundongos (YU; ROBSON; HILL, 2011) e tem baixa atividade em linhagem de câncer de bexiga de grau 1 (RT4) em comparação a linhagem de grau 3 (T24) (STELLA et al., 2010), o que evidencia a possível participação desta proteína na progressão do câncer de bexiga. Além disso, um estudo prévio do nosso laboratório demonstrou que inibidores dessa enzima, como a quercetina, podem ser bons candidatos para o desenvolvimento de novos tratamentos (ROCKENBACH et

al., 2013). Logo, a possível perda da expressão da NTPDase 3 e ganho da ecto-5'-NT/CD73, podem ser alterações importantes da sinalização purinérgica para progressão do câncer de bexiga e merecem ser melhor investigadas.

2. OBJETIVO

O objetivo geral desta tese foi investigar o envolvimento da NTPDase3 e da ecto-5'-NT/CD73 na progressão e malignidade do câncer de bexiga.

2.1 Objetivos específicos

Esta tese será apresentada em três capítulos que visaram atingir os seguintes objetivos:

Capítulo I:

- Investigar a expressão das enzimas NTPDase3 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 durante a progressão do estabelecimento do câncer de bexiga induzido por BBN em camundongos.

Capítulo II:

- Padronizar a indução do câncer de bexiga em ratos e investigar as alterações que ocorrem na hidrólise dos nucleotídeos com a transformação maligna do urotélio.

Capítulo III:

- Investigar o efeito da super-expressão da NTPDase3 e do silenciamento da ecto-5'-nucleotidase/CD73 no crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*.

3. CAPÍTULO I

NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression

Artigo publicado na revista Purinergic Signaling.

4. CAPÍTULO II

Caracterização das atividades das ectonucleotidases por histoquímica em modelo de câncer de bexiga induzido por N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina em ratos

Após verificar a inversão da imunofluorescência da NTPDase3 e da ecto-5'-NT/CD73 no câncer de bexiga induzido por N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN) em camundongos em relação ao tecido sadio (ROCKENBACH et al., 2014)(Capítulo 1), o próximo passo foi investigar se a atividade dessas proteínas acompanha essas alterações. A literatura mostra que indução do câncer de bexiga pela BBN em ratos requer menos tempo e resulta em tumores mais proeminentes (PARADA et al., 2009, 2011; SERENO et al., 2010). Dessa forma, a fim de otimizar a metodologia também objetivamos padronizar o método de indução de câncer de bexiga por BBN em ratos.

5. CAPÍTULO III

Efeito da super-expressão da NTPDase3 e do silenciamento da ecto-5'-nucleotidase/CD73 no crescimento do câncer de bexiga in vitro e in vivo.

Uma vez que o envolvimento da NTPDase3 e da ecto-5'-nucleotidase/CD73 na progressão do câncer de bexiga foi evidenciado devido à alteração da expressão e da atividade dessas enzimas *in vitro* (Stella et al., 2010) e *in vivo* (Capítulos 1 e 2), a importância dessas enzimas para o crescimento e progressão do carcinoma urotelial foi também investigada. Esta investigação foi feita através da construção de linhagens T24 super-expressando a NTPDase3 ou com a ecto-5'-nucleotidase/CD73 silenciada, isto é, a partir de uma linhagem maligna proveniente de um tumor de grau 4 foram obtidas células com o perfil das enzimas purinérgicas do tecido saudável.

6. DISCUSSÃO

O câncer de bexiga é a segunda neoplasia urogenital mais comum, (MORI et al., 2009; SHABBIR et al., 2008; SWELLAM et al., 2003) atinge mais os homens e está relacionada principalmente com o fumo (JACOBS; LEE; MONTIE, 2010) e a idade. Apesar de possuir tratamento, este tipo de tumor continua sendo amplamente estudado devido aos muitos casos de recorrência e progressão tumoral (“American Cancer Society”, [s.d.]; DOZMOROV et al., 2006; JACOBS; LEE; MONTIE, 2010; MA et al., 2006; SHABBIR et al., 2008). Atualmente, o tratamento mais efetivo para tratar carcinomas de bexiga *in situ* é a instilação intravesical de BCG, contudo, em aproximadamente 20 a 40% dos pacientes os tumores recorrem (JACOBS; LEE; MONTIE, 2010). Além disso, a instilação de BCG tem efeitos adversos como dor vesical, hematúria, febre, sendo que o mais comum é cistite e o mais grave a sepse (JACOBS; LEE; MONTIE, 2010). A quimioterapia é utilizada como tratamento adjuvante, junto à cistectomia radical ou radioterapia, para o tratamento de tumores de bexiga de maior grau de malignidade. Ela consiste em injetar a droga que fica sistematicamente disponível e então pode atingir e matar as células tumorais. Contudo, a maioria das drogas é tóxica tanto para o tumor quanto para as células normais, por isso causa tantos efeitos adversos nos pacientes (LÓPEZ-LÁZARO, 2010). Portanto, as investigações correntes visam tratamentos mais efetivos em evitar os casos de recorrência e progressão tumoral e cujos alvos terapêuticos sejam exclusivos das células tumorais, minimizando os efeitos adversos.

No que diz respeito a possíveis novos alvos terapêuticos, o sistema purinérgico tem sido descrito por estar envolvido no processo de progressão de diversos tipos de câncer (BRAGANHOL et al., 2009; STAGG et al., 2010; WHITE;

BURNSTOCK, 2006), inclusive o câncer de bexiga (BURNSTOCK, 2011; SHABBIR; BURNSTOCK, 2009; STELLA et al., 2010). Nosso grupo mostrou que na progressão do câncer de bexiga *in vitro* há uma inversão na atividade de hidrólise dos nucleotídeos, onde, em uma linhagem de tumor de grau 1 há uma alta hidrólise de nucleotídeos di- e trifosfatados, pela NTPDase3, e a hidrólise dos nucleotídeos monofosfatados é baixa; enquanto na linhagem T24, de grau 3, há baixa hidrólise de nucleotídeos di- e trifosfatados e em contraste há uma alta atividade da ecto-5'-NT/CD73 (STELLA et al., 2010). Esses resultados já demonstravam uma possível associação dessas enzimas com a malignidade do tumor de bexiga, e foram fortalecidos pelo trabalho de Yu, et al., 2011, que mostrou que o urotélio sadio de camundongos expressa a NTPDase3 e não expressa a ecto-5'-NT/CD73, justificando a investigação do envolvimento dessas duas proteínas na progressão e malignidade do câncer de bexiga.

O primeiro passo desse trabalho foi investigar a expressão das enzimas NTPDase3 e ecto-5'-NT/CD73 durante o estabelecimento e a progressão do câncer de bexiga induzido por N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN) em camundongos (Capítulo 1). Os resultados mostraram que, após 4 e 8 semanas de ingestão, as alterações celulares induzidas pela BBN, são características histopatológicas típicas de quadro inflamatório, com forte edema na submucosa e algumas lesões pré-neoplásicas (Capítulo 1/ "Table 1"). Além disso, o peso úmido das bexigas foi significativamente maior nos camundongos que receberam BBN por 4 e 8 semanas (Capítulo 1/ "Figure 1"), o que está de acordo com o forte edema observado na bexiga desses animais por coloração de HE (Capítulo 1/ "Figure 2").

Após 12 semanas e principalmente após 18 semanas, pode-se observar uma progressiva diminuição do quadro inflamatório, ao mesmo tempo, que aumentam as

transformações malignas das células uroteliais. Finalmente, em 24 semanas as bexigas dos camundongos apresentaram apenas características de carcinoma de células transicionais (Capítulo 1/ “Table 1”). Essa seqüência de alterações concorda com dados da literatura nos quais é bem estabelecido que a administração por longo tempo de compostos carcinogênicos leva a uma série de mudanças proliferativas na mucosa da bexiga antes do desenvolvimento de um tumor invasivo (COHEN et al., 1976; ITO, 1976; OYASU et al., 1978). Primeiro ocorre hiperplasia seguida de hiperplasia papilar e/ou nodular e então carcinoma invasivo (OYASU et al., 1978).

Conforme suscitado pela literatura, a NTPDase3 expressa nas células do urotélio sadio (YU; ROBSON; HILL, 2011) e na linhagem de câncer de bexiga de grau 1 de malignidade (RT4) (STELLA et al., 2010), tem sua expressão diminuída ao longo do processo de estabelecimento do câncer de bexiga *in vivo* (Capítulo1/ “Figure 3”). Pouco é conhecido a respeito do papel da NTPDase3 no câncer, no caso do carcinoma urotelial de bexiga, a ausência da única NTPDase expressa pelo urotélio normal pode estar relacionada à desregulação dos níveis extracelulares dos nucleotídeos ATP e ADP. Uma vez que o ATP é responsável pelo reflexo de micção (YU; ROBSON; HILL, 2011), a ausência da NTPDase3 pode levar ao acúmulo deste nucleotídeo o que pode estar relacionado á urgência miccional, um dos possíveis sintomas desta malignidade (SILVA-RAMOS et al., 2015). Esses achados sugerem novas perspectivas, entretanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese .

Também de acordo com a literatura, a ecto-5'-NT/CD73 que não é expressa no urotélio sadio (YU; ROBSON; HILL, 2011), mas é expressa em linhagens de câncer de bexiga (STELLA et al., 2010), é expressa no urotélio inflamado e tem sua expressão significativamente aumentada no urotélio canceroso *in vivo* (Capítulo1/

“Figura 4”). O aumento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 não é exclusivo do câncer de bexiga, já foi mostrado em outros tipos de câncer como: mama, glioma e melanoma (BAVARESCO et al., 2008; MUNOZ et al., 2010; SPYCHALA, 2000), evidenciando sua possível ligação com o processo de transformação neoplásica. A ausência de expressão da ecto-5'-NT/CD73 no urotélio sadio e em contrapartida sua alta expressão no tecido tumoral a converte em um potente alvo terapêutico.

Verificada a inversão no imunoconteúdo da NTPDase3 e da ecto-5'-NT/CD73 no câncer de bexiga induzido por BBN em camundongos em relação ao tecido sadio (ROCKENBACH et al., 2014) (Capítulo 1), o próximo passo foi padronizar o método de indução de câncer de bexiga por BBN em ratos e investigar se a atividade enzimática dessas proteínas acompanhava essas alterações (Capítulo 2).

A toxicidade da BBN se limita ao urotélio e mimetiza o que acontece no câncer de bexiga humano, o acúmulo de um carcinógeno por tempo prolongado que induz alterações celulares até culminar no desenvolvimento do câncer (COHEN et al., 1976; ITO, 1976; OYASU et al., 1978). De acordo com essa toxicidade limitada, no estabelecimento do câncer de bexiga de ratos, observamos que não houve diferença entre o peso corporal dos animais que receberam BBN e o dos animais controle (Capítulo 2/ Figura 8). O peso úmido da bexiga costuma ser uma medida de edema (DIETRICH et al., 2015) quando se trata de inflamação, nós mostramos que esta medida foi significativamente maior para os ratos que receberam BBN por 24 semanas em relação aos animais controle (Capítulo 2/ Figura 9) e isso, provavelmente, se deve à presença dos tumores papilares.

Vários artigos científicos mostram a indução do câncer de bexiga em ratos após 12 semanas de consumo de BBN 0,05%, em nosso estudo, após 12 semanas observamos apenas características de inflamação, e somente após 16 semanas

observamos o início de transformações neoplásicas (Capítulo 2/ Figura 7). O aparecimento de tumores papilares proeminentes foi observado somente após 24 semanas (Capítulo 2/ Figura 10). Apesar de mais tardia a indução do câncer de bexiga pela adição de BBN a água de beber dos animais foi 100% efetiva, tanto em ratos como em camundongos (Capítulo 1), o que representa uma vantagem frente a outras metodologias de administração, como a instilação intravesical de N-metil-N-nitrosureia, que além de mais invasiva é menos efetiva (REIS et al., 2015).

A análise histopatológica das bexigas extraídas após 24 semanas de indução, apresentou características de câncer de bexiga, como perda das células “umbrella”, metaplasia escamosa, núcleos atípicos, erosão e perda de coesão entre as células e infiltrado inflamatório intratumoral (Capítulo 2/ Figuras 10 e 11, Tabela 3).

A proteína Ki67 é uma proteína nuclear (não histona) que está presente exclusivamente na fase ativa da célula e cuja expressão está estritamente relacionada ao ciclo celular, estando aumentada durante as fases G2, M e na última metade da fase S (TAN et al., 2005). Esta proteína é usada como marcador de proliferação celular e vem sendo associada com mau prognóstico em indivíduos com câncer de bexiga, cérebro, mama, rim, pulmão, entre outros (JOHANNESSEN; TORP, 2006; KANKURI et al., 2006; KILICLI-CAMUR et al., 2002; MÜNSTEDT; VON GEORGI; FRANKE, 2004; SHIBA et al., 2000; STUART-HARRIS et al., 2008). A malignidade do tumor induzido com BBN é comprovada pela marcação intensamente positiva para Ki67 na bexiga dos animais com carcinoma, comparada aos animais controle (Capítulo 2/ Figura 13).

Os resultados da determinação da atividade de NTPDase3 diretamente em fatias de tecido mostrou que a hidrólise de ATP e ADP é maior no urotélio da bexiga dos animais controle do que no urotélio canceroso, e é maior para o ATP do que

para o ADP (Capítulo 2/ Figura 14). Estes dados estão plenamente de acordo com a enzima responsável por essa hidrólise, a NTPDase3, que hidrolisa mais ATP do que ADP, e cuja expressão diminui com a progressão do câncer (ROCKENBACH et al., 2014) (Capítulo 1). A forte hidrólise desses nucleotídeos observada no músculo e nos vasos deve-se a presença da NTPDase1 nessas estruturas, e a NTPDase2 na lâmina própria (YU; ROBSON; HILL, 2011). Entretanto, a mesma metodologia não pode ser utilizada para a avaliação da atividade de hidrólise do AMP (Capítulo 2). Na tentativa de resolver esse problema, fizemos duas modificações na técnica, aumentamos a concentração de substrato para 2mM e tempo para 45 minutos. Mesmo assim, a coloração resultante não foi intensa o suficiente, evidenciando uma possível instabilidade ou alteração estrutural da proteína que pode ter sido causada pelo processo de congelamento/descongelamento. Dessa forma, para a hidrólise do AMP precisamos tentar outras alterações nas condições de ensaio.

A ação enzimática da NTPDase3 e da ecto-5'-NT/CD73 resultam, respectivamente, na hidrólise do ATP e na produção de adenosina, que tem atividade imunossupressora. A inflamação age em todos os estágios da tumorigênese, nos estágios iniciais cria um microambiente que favorece mutações, instabilidade genômica e modificações epigenéticas; enquanto na progressão do câncer estimula a angiogênese, escape imune e o crescimento tumoral (COUSSENS; WERB, 2002; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). O ATP e a adenosina participam dessa sinalização inflamatória (BOURS et al., 2006). O ATP tem sido descrito como uma molécula pró-inflamatória que atua como um sinal quimiotático para fagócitos (SÄVE; PERSSON, 2010; STAGG; SMYTH, 2010), enquanto a adenosina tem um papel imunossupressor por inibir as respostas imunes inatas e a adaptativas (STAGG; SMYTH, 2010). A participação da expressão

alterada das ectonucleotidases já foi descrita e relacionada com a modulação das células imune que contribui com a progressão do câncer em gliomas (BERGAMIN et al., 2012); câncer cerebral agressivo que tem um padrão de atividade ATP/ADP/AMPase semelhante ao câncer de bexiga. No glioma o perfil de metabolismo dos nucleotídeos favorece o acúmulo de ATP e adenosina no interstício tumoral, assim, enquanto o ATP é capaz de induzir a morte das células saudáveis que circundam o tumor, proliferação tumoral, e recrutamento de células imune, a adenosina é responsável pela angiogênese e imunossupressão (BERGAMIN et al., 2012). No câncer de bexiga este mesmo acúmulo de ATP e adenosina deve ocorrer à medida que, conforme mostrado neste estudo, há diminuição da expressão e atividade da NTPDase3 e aumento da expressão da ecto-5'-NT/CD73. Embora a atividade antitumoral da BCG seja devida à estimulação da resposta imune aguda local e recrutamento de neutrófilos (LEE et al., 2009), a presença do ATP e da adenosina pode ser importante na criação das condições inflamatórias crônicas observadas no microambiente tumoral, as quais suprimem a resposta imune. Esta hipótese é reforçada pela crescente presença de células imunes no urotélio durante o tratamento com BBN. Além disso, a presença massiva de macrófagos associados ao tumor nos estágios clínicos tardios de pacientes com câncer de bexiga (ZHANG et al., 2012) e a associação entre infiltrado linfocítico tumoral e a recorrência do câncer de bexiga não músculo invasivo (KRPINA et al., 2012) sugere a relação entre o processo inflamatório crônico e à progressão tumoral.

Além disso, ambos, ATP e adenosina têm sido extensivamente descritos por participarem na sinalização de processos fisiopatológicos na bexiga (BURNSTOCK, 2013; KUMAR; CHAPPLE; CHESS-WILLIAMS, 2004; MUNOZ et al., 2010; WANG et al., 2005; YU et al., 2006; YU; ROBSON; HILL, 2011). O urotélio é sítio de liberação

de ATP (KUMAR; CHAPPLE; CHESS-WILLIAMS, 2004; MUNOZ et al., 2010; YU; ROBSON; HILL, 2011) e também de biosíntese de adenosina, e ambos, ATP e adenosina, atuam na exocitose nas células “umbrella” (WANG et al., 2005; YU et al., 2006) que é o mecanismo pelo qual estas células aumentam sua superfície luminal quando a bexiga se distende pelo conteúdo urinário aumentado. Para aumentarem sua superfície luminal, vesículas citoplasmáticas discoidias/fusiformes fundem com a membrana plasmática apical (TRUSCHEL et al., 2002). O ATP liberado pelo urotélio é também responsável pelo reflexo de micção, através dos receptores P2X3 das fibras nervosas subepiteliais (FORD; COCKAYNE, 2011). Então, embora precisem ser melhor elucidados, nossos resultados sugerem que as mudanças na expressão e atividade da NTPDase3 e da ecto-5'-NT/CD73 que ocorrem com a transformação maligna das células uroteliais, acabariam por perturbar a sinalização dos nucleotídeos na bexiga e conseqüentemente afetar suas funções.

As células de câncer de bexiga não hidrolisam o ATP de forma eficaz devido a ausência ou diminuição da expressão e atividade da NTPDase3 em sua membrana plasmática, assim, no microambiente tumoral há um acúmulo de ATP. O ATP é capaz de induzir a morte das células sadias que circundam o tumor, proliferação tumoral, e recrutamento de células imune (BERGAMIN et al., 2012). Além disso, na periferia do tumor esse ATP também pode ser eficazmente hidrolisado até AMP pelas células normais adjacentes que expressam a NTPDase3, mas que por não expressarem a ecto-5'-NT/CD73 não são capazes de hidrolisar o AMP (YU; ROBSON; HILL, 2011). Este AMP gerado na interface tecido-tumor, se não hidrolisado, é tóxico para as células tumorais (ROCKENBACH et al., 2013), mas a expressão da ecto-5'-nucleotidase nas células de carcinoma de bexiga as torna capazes de hidrolisar o AMP até adenosina, funcionando como mecanismo de

“proteção” para o tumor. Além disso, a adenosina poderia ser captada pelas células tumorais e seqüencialmente refosforilada até ATP, que é muito importante para estas células devido ao seu alto gasto energético produto do seu metabolismo acelerado e da sua alta taxa de proliferação, auxiliando na progressão tumoral. Apesar da adenosina não ter efeitos proliferativos sobre as linhagens humanas de câncer de bexiga (ROCKENBACH et al., 2013), ela é amplamente descrita como uma molécula que contribui para o crescimento de diversos tumores pelo seu papel imunossupressivo (STAGG; SMYTH, 2010). A figura 29 resume essa seqüência de acontecimentos que culmina na ecto-5'-NT/CD73 protegendo o tumor e auxiliando na sua progressão através da adenosina.

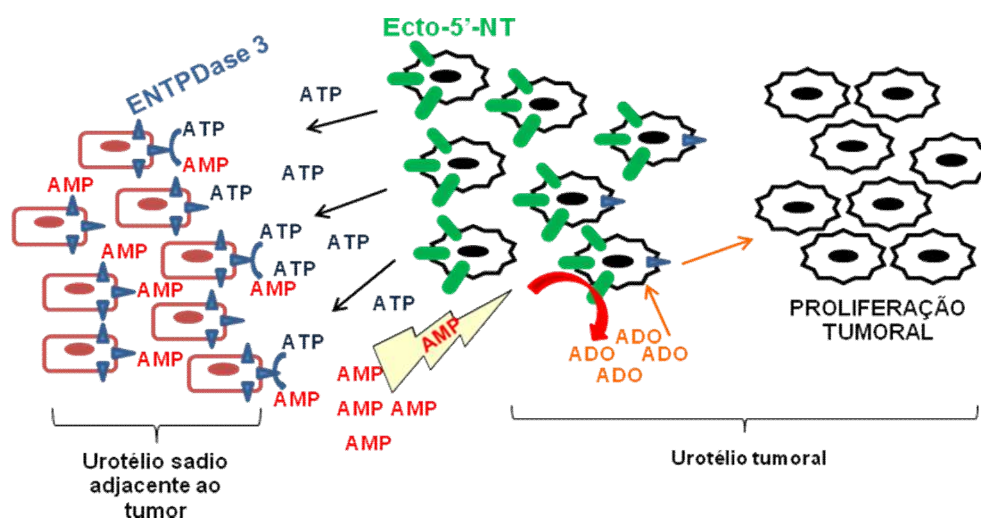


Figura 29. Modelo proposto para as funções enzimáticas de proteção e progressão tumoral da ecto-5'-NT/CD73 em câncer de bexiga. As células tumorais de bexiga possuem baixíssima expressão e atividade de NTPDase3, o que permite o acúmulo de ATP no tumor. Na periferia do tumor, este ATP poderia levar as células saudáveis à morte, mas as células saudáveis possuem alta expressão e atividade de NTPDase3 convertendo eficazmente o ATP em AMP. Este AMP gerado na interface tecido sadio/Tumor é tóxico para as células transicionais cancerosas cuja alta expressão e atividade de ecto-5'-NT/CD73 serve como proteção ao converter AMP em ADO. Por fim, a adenosina gerada participa da promoção da proliferação e progressão tumorais.

Para entender e a fim de melhor elucidar a importância dessa inversão na expressão e atividade das enzimas NTPDase3 e ecto-5'-NT/CD73 na progressão do câncer de bexiga, novas ferramentas de trabalho foram construídas durante meu estágio “sanduíche” no Laboratório do Dr. Jean Sèvigny na Universidade de Laval, em Québec, no Canadá. Assim, células T24 super expressando a NTPDase3 e células T24 silenciadas para ecto-5'-NT/CD73 foram produzidas, e a seleção de diferentes clones foi realizada, os quais foram utilizados para avaliar a progressão do câncer de bexiga em modelo *in vitro* e *in vivo* (Capítulo 3).

Primeiramente, a eficácia da superexpressão da NTPDase3 com o plasmídeo pcDNA3 contendo o gene de resistência à geneticina foi comprovada pela caracterização dos clones que mostraram aumento na expressão da proteína na membrana plasmática das células acompanhado do aumento de cerca de 30 vezes na atividade de hidrólise de ATP (Capítulo 3/ Figura 17). O crescimento em cultura das células de câncer de bexiga T24 superexpressando a NTPDase3 foi mais lento do que as células T24 selvagem (Capítulo 3/ Figura 21). Em especial o crescimento do clone 94 mostrou-se significativamente mais lento (Capítulo 3/ Figura 21), o que precisa ser melhor investigado para entendermos o quanto essa alteração é resultado da maior expressão da NTPDase3, que é característica de célula urotelial saudável. Interessantemente, foi observado aumento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 no clone 94 que superexpressa a NTPDase3, (Capítulo 3/ Figura 22). No entanto, este aumento da expressão não se refletiu na atividade da ecto-5'-NT/CD73, que permaneceu inalterada (Capítulo 3/ Figura 22), sugerindo uma possível ligação entre a regulação da expressão dessas duas enzimas ainda não mostrada na literatura. Esse aumento de expressão precisa ser investigado, pois pode refletir alterações nas funções que a ecto-5'-NT/CD73 tem como proteína, por

exemplo, na migração e adesão celular (WANG et al., 2008; ZHANG, 2012; ZHOU et al., 2007).

O silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 com o sistema CRISPR/Cas foi efetivo. Este sistema descoberto como “sistema imune de bactérias” foi aperfeiçoado para atingir a melhor eficiência possível em células humanas (HWANG et al., 2013; LIU et al., 2015; RAN et al., 2013). A sua alta eficiência de transfecção deve-se à ação da enzima Cas9, que por quebrar as duas fitas do DNA dificulta a ação do sistema de reparo, aumentando a probabilidade de deleções e inserções errôneas de nucleotídeos (LIU et al., 2015; RAN et al., 2013). Dois dos clones resultantes do silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 foram escolhidos: um com cerca de metade da expressão e da atividade da enzima e um totalmente silenciado (Capítulo 3/ Figura 20). Este clone parcialmente silenciado deve-se provavelmente ao silenciamento de somente um dos alelos da ecto-5'-NT/CD73 no cromossomo 6, de forma que o outro alelo é responsável pela expressão remanescente da enzima ativa. O perfil de expressão/atividade dos clones escolhidos representa uma importante ferramenta experimental, estas células podem ser testadas frente a diferentes mecanismos e quando produzirem respostas correspondentes ao grau de expressão da enzima ficará evidenciado a relação direta da ecto-5'-NT/CD73 com essa característica.

O silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 não alterou nem a expressão nem tão pouco a atividade da NTPDase3, mostrando que sua expressão não regula a expressão da enzima “up stream” (Capítulo 3/ Figura 23).

O tratamento dos diferentes clones com os principais sinalizadores purinérgicos ATP, AMP e adenosina mostrou que não há uma ligação entre a superexpressão da NTPDase3 e o silenciamento da ecto-5'-nucleotidase com a sensibilidade a estes tratamentos (Capítulo 3/ Figuras 24 e 25). A maior

sensibilidade ao tratamento com adenosina 0,1 mM foi observada nas três células transfectadas, incluindo o vetor vazio, portanto, não correlacionada com a superexpressão da NTPDase3 mas com o processo de transfecção. O potencial antiproliferativo do ATP 1 mM está de acordo com o estudo feito por Shabbir et al., 2007, onde o ATP reduz o crescimento celular de maneira dose dependente pela ativação dos receptores P2X₅ e P2Y₁₁. O forte efeito antiproliferativo da adenosina 1 mM ainda não havia sido demonstrado, contudo, não surpreende uma vez que se trata de uma concentração suprafisiológica e a literatura mostra efeitos antiproliferativos da ativação de receptores P1 (KIM et al., 2010; STAGG; SMYTH, 2010).

Finalmente, observamos que não houve diferença significativa no crescimento e no peso dos tumores produzidos pelos clones da ecto-5'-NT/CD73 silenciada inoculados no flanco dorsal de camundongos imunossuprimidos (Capítulo 3/ Figura 26). Porém, a avaliação do tamanho do tumor extraído, mostra uma tendência à diminuição nos com menor expressão da ecto-5'-NT/CD73. Este dado é reforçado pela provável maior malignidade do tumor proveniente da linhagem T24 selvagem, observada nas lâminas coradas com HE, devido ao maior número de células, a maior coesão entre as células e a maior quantidade de infiltrado inflamatório (Capítulo 3/ Figura 27) e por fim pela maior taxa de proliferação mostrada na marcação com Ki67 (Capítulo 3/ Figura 28). Uma vez que estes resultados foram obtidos a partir de um pequeno grupo amostral, devido à baixa disponibilidade deste tipo de animal no UEA/HCPA, a repetição da metodologia com aumento do número amostral será necessária para confirmar se a tendência à diminuição dos tumores esta relacionada com o silenciamento da ecto-5'-NT/CD73.

Além do envolvimento da ecto-5'-NT/CD73 na progressão tumoral devido a sua atividade enzimática de degradação do AMP gerando adenosina e sua participação no escape imune tumoral (STAGG; SMYTH, 2010), a relação entre a diminuição no tamanho dos tumores com a expressão desta proteína pode também estar ligada às suas funções não enzimáticas. Alguns trabalhos mostram que a superexpressão da ecto-5'-NT/CD73 promove invasão, migração, adesão e metástase em células de câncer de mama humano (STAGG et al., 2010; ZHOU et al., 2007), mostrando também maior invasão e capacidade metastática em melanomas (SADEJ; SPYCHALA; SKLADANOWSKI, 2006; STAGG et al., 2011). Ainda Mikhalov e colaboradores mostraram que a proteína ecto-5'-NT/CD73 participa da multirresistência celular e protege linhagem de leucemia (Jurkat/ A4) da morte apoptótica induzida por TRAIL, “tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand” (ligante indutor de apoptose relacionado à necrose tumoral) (MIKHAILOV et al., 2008). No mesmo trabalho foi mostrado que células de leucemia que superexpressam a ecto-5'-NT/CD73 são resistentes à morte induzida por TRAIL, enquanto que o silenciamento desta proteína sensibiliza as células para este tipo de morte. Este efeito da ecto-5'-NT/CD73 é provavelmente devido à interação com o receptor de TRAIL, o DR5, que está co-localizado com esta enzima, e independe da atividade de hidrólise do AMP (MIKHAILOV et al., 2008). O TRAIL é ligante indutor de apoptose relacionado à necrose tumoral, sendo capaz de induzir seletivamente as células de câncer à apoptose sem efeitos nas células sadias normais (SILVA et al., 2014; WHITE-GILBERTSON et al., 2009). O TRAIL induz apoptose pela via extrínseca por sua afinidade pelos receptores de morte DR4 e DR5 (SILVA et al., 2014; WHITE-GILBERTSON et al., 2009). Além disso, já foi demonstrado que a liberação de TRAIL por neutrófilos está envolvida na ação antitumoral do BCG,

tratamento padrão após a ressecção transuretral do câncer de bexiga (LUDWIG et al., 2004; SIMONS; O'DONNELL; GRIFFITH, 2008), de forma que tumores com alta expressão da ecto-5'-NT/CD73 são provavelmente menos responsivos ao tratamento com BCG (Figura 30).

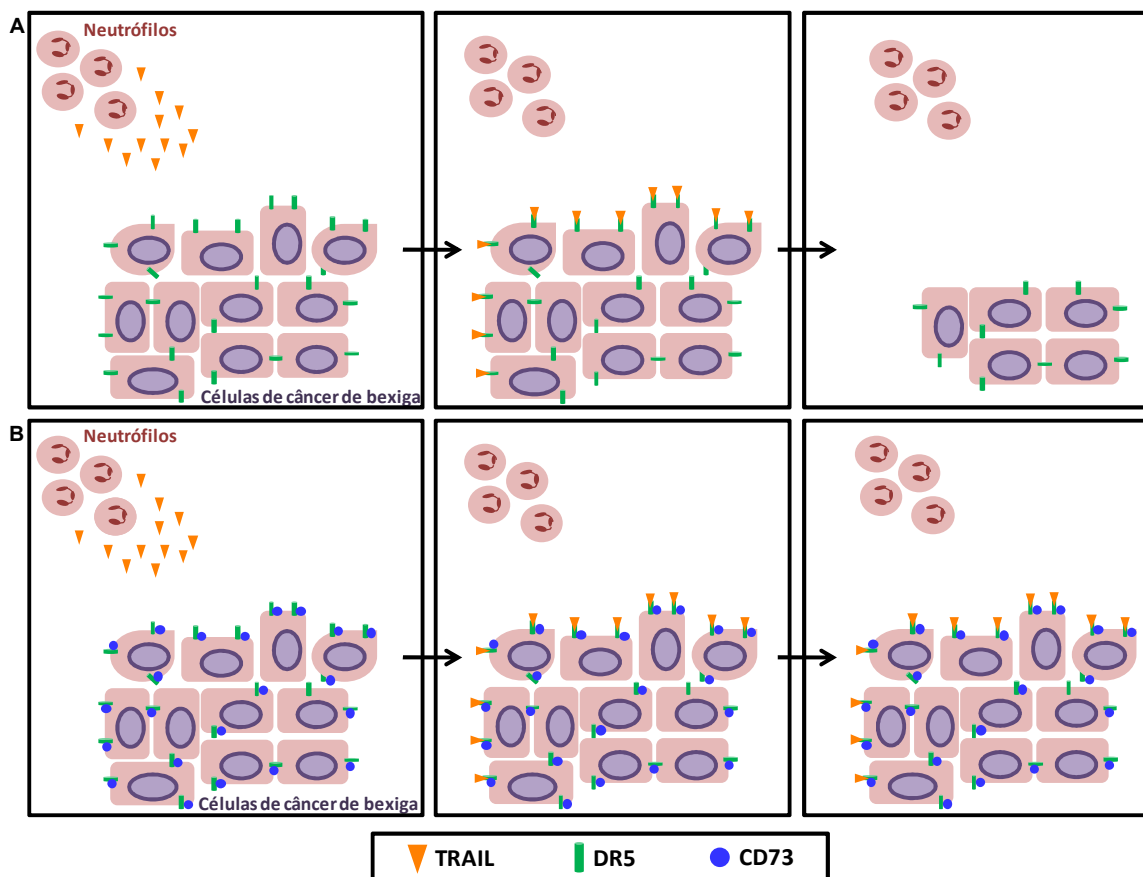


Figura 30. Modelo proposto para a função não enzimática da ecto-5'-nucleotidase de proteção e progressão tumoral em câncer de bexiga. Conforme já demonstrado para linhagem de leucemia, e parte do mecanismo de ação da instilação intravesical de BCG, (A) os neutrófilos liberam TRAIL que liga no seu receptor DR5 nas células de câncer levando essas células a morte apoptótica. (B) No entanto, quando há alta expressão de ecto-5'-NT/CD73, esta proteína, por um mecanismo independente de sua atividade enzimática, leva ao escape da morte por TRAIL por se associar e inativar o receptor DR5 contribuindo para a progressão tumoral.

Portanto, a diminuição da NTPDase3 é importante para a progressão do câncer por causar acúmulo de ATP no microambiente tumoral, enquanto o aumento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 contribui para malignidade tanto através do seu papel enzimático de gerar adenosina como pelas suas ações na promoção de invasão, migração e por impedir a morte celular induzida por TRAIL.

Por fim, esta tese mostra em diferentes sistemas, *in vitro* e *in vivo*, que a alteração tanto da expressão quanto da atividade das ectonucleotidases envolvidas no câncer de bexiga, a NTPDase3 e a ecto-5'-NT/CD73, está provavelmente vinculada à progressão desta malignidade. Apesar de mais estudos serem necessários para compreender os mecanismos pelos quais estas enzimas participam da malignidade do câncer de bexiga e se essas alterações são causa ou consequência da transformação maligna do urotélio, a ecto-5'-NT/CD73 se mostra cada vez mais um importante novo alvo para futuros tratamentos dessa malignidade.

7. CONCLUSÕES

- 1) A NTPDase3 tem sua expressão e atividade diminuídas com o estabelecimento e progressão do câncer de bexiga;
- 2) A ecto-5'-nucleotidase/CD73 passa a ser expressa durante a inflamação do urotélio e tem sua expressão significativamente aumentada no câncer de bexiga;
- 3) O modelo de câncer de bexiga induzido por BBN em ratos foi padronizado com sucesso;
- 4) Como já descrito na literatura para outros tipos de tumor, a expressão da ecto-5'-nucleotidase somente nas células uroteliais tumorais evidencia seu envolvimento com a progressão do câncer de bexiga;
- 5) A superexpressão da NTPDase3 e o silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 foram realizados com sucesso, constituindo novas ferramentas de trabalho para os estudos com câncer de bexiga.
- 6) Apesar de necessitar de repetição para aumento do número amostral, os resultados parciais com o modelo xenográfico mostram a relevância da ecto-5'-NT/CD73 para o crescimento tumoral *in vivo* do carcinoma de células transicionais da bexiga;
- 7) A ecto-5'-NT/CD73 mostrou-se um promissor alvo terapêutico para o tratamento do câncer de bexiga, principalmente por ser exclusivo das células uroteliais malignas.

8. PERSPECTIVAS

- 1) Fazer os ajustes necessários para padronização da técnica de histoquímica enzimática para avaliação da atividade ecto-5'-NT/CD73 nas bexigas dos ratos com câncer de bexiga induzido por BBN;
- 2) Investigar possíveis alterações na expressão dos receptores purinérgicos nas bexigas dos ratos com câncer de bexiga induzido por BBN;
- 3) Analisar a toxicidade de diferentes tratamentos como quercetina, resveratrol e cisplatina nos clones com superexpressão da NTPDase3 e nos clones com a ecto-5'-NT/CD73 silenciada;
- 4) Repetir os experimentos de inoculação das células silenciadas para ecto-5'-NT/CD73 nos camundongos imunossuprimidos;
- 5) Inocular as células com superexpressão de NTPDase3 nos camundongos imunossuprimidos para melhor entender a importância dessa proteína na malignidade do câncer de bexiga;
- 6) Investigar o possível envolvimento da ecto-5'-NT/CD73 na sensibilização e potencialização da morte apoptótica induzida por TRAIL pela cisplatina e pela curcumina, bem como demonstrar a efetividade da ecto-5'-NT/CD73 como alvo terapêutico para quimioterapias adjuvantes no tratamento de câncer de bexiga.

9. REFERÊNCIAS

AL-RASHIDA, M.; IQBAL, J. Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 4, p. 703–743, jul. 2014.

American Cancer Society. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

BAVARESCO, L. et al. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 319, n. 1-2, p. 61–68, dez. 2008.

BERGAMIN, L. S. et al. Ectonucleotidases in tumor cells and tumor-associated immune cells: an overview. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 959848, 2012.

BIANCHI, V.; SPYCHALA, J. Mammalian 5'-nucleotidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46195–46198, 21 nov. 2003.

BOEIRA, V. T. et al. Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 384, n. 3, p. 265–275, set. 2011.

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, nov. 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRAGANHOL, E. et al. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. **Cancer Science**, v. 100, n. 8, p. 1434–1442, ago. 2009.

BRISEVAC, D. et al. Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1-3 (NTPDase1-3) by cortical astrocytes after exposure to pro-inflammatory factors in vitro. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 51, n. 3, p. 871–879, nov. 2013.

BURNSTOCK, G. Introduction: P2 receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 793–803, 2004.

BURNSTOCK, G. Therapeutic potential of purinergic signalling for diseases of the urinary tract. **BJU international**, v. 107, n. 2, p. 192–204, jan. 2011.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in the lower urinary tract. **Acta Physiologica (Oxford, England)**, v. 207, n. 1, p. 40–52, jan. 2013.

BYUN, S. J. et al. Concurrent chemoradiotherapy improves survival outcome in muscle-invasive bladder cancer. **Radiation Oncology Journal**, v. 33, n. 4, p. 294–300, dez. 2015.

CAPPELLARI, A. R. et al. Characterization of ectonucleotidases in human medulloblastoma cell lines: ecto-5'NT/CD73 in metastasis as potential prognostic factor. **PloS One**, v. 7, n. 10, p. e47468, 2012.

CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375–380, set. 1986.

CHEN, G. et al. Identification of differently expressed genes in chemical carcinogen-induced rat bladder cancers. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban**, v. 29, n. 2, p. 220–226, abr. 2009.

CHUNG, K.-T.; GADUPUDI, G. S. Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, n. 2, p. 81–104, mar. 2011.

COHEN, S. M. et al. Early lesions in experimental bladder cancer: experimental design and light microscopic findings. **Cancer Research**, v. 36, n. 7 PT 2, p. 2508–2511, jul. 1976.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 19 dez. 2002.

DaHora Online. Disponível em <http://www.dahoraonline.com/index.php?ap=2¬icia=12470>. Acesso em : 02 março. 2016.

DEMIRCI, U. et al. Radiotherapy concurrent with weekly gemcitabine after transurethral tumor resection in muscle invasive bladder cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 11, n. 4, p. 704–707, dez. 2015.

DIETRICH, F. et al. The Quinovic Acid Glycosides Purified Fraction from *Uncaria tomentosa* Protects against Hemorrhagic Cystitis Induced by Cyclophosphamide in Mice. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0131882, 2015.

Diretrizes AMB. Diretrizes AMB, 7 jun. 2016. Disponível em: <<http://diretrizes.amb.org.br/d-antigas/>>. Acesso em: 26 jun. 2016

DOZMOROV, M. G. et al. Analysis of the interaction of extracellular matrix and phenotype of bladder cancer cells. **BMC cancer**, v. 6, p. 12, 2006.

FERRARI, D. et al. Purinergic signaling in atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 3, p. 184–192, mar. 2015.

FIGUEIRÓ, F. et al. Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. **Purinergic Signalling**, v. 12, n. 2, p. 303–312, jun. 2016.

FIOCRUZ. **Apostilha de Manipulação de animais**. Disponível em: <<http://www.rgarson.com/>>. Acesso em: 27 jun. 2016.

FORD, A. P. D. W.; COCKAYNE, D. A. ATP and P2X purinoceptors in urinary tract disorders. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 202, p. 485–526, 2011.

Globocan 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 19 mar. 2010.

GUI, Y. et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. **Nature Genetics**, v. 43, n. 9, p. 875–878, set. 2011.

HAN, E. et al. Rosiglitazone Use and the Risk of Bladder Cancer in Patients With Type 2 Diabetes. **Medicine**, v. 95, n. 6, p. e2786, fev. 2016.

HE, M.-L. et al. Release and extracellular metabolism of ATP by ecto-nucleotidase eNTPDase 1-3 in hypothalamic and pituitary cells. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 135–144, jun. 2005.

HWANG, W. Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227–229, mar. 2013.

INCA, **2016**. Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga>>.

Acesso em: 26 jun. 2016.

ITO, N. Early changes caused by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in the bladder epithelium of different animal species. **Cancer Research**, v. 36, n. 7 PT 2, p. 2528–2531, jul. 1976.

JACOBS, B. L.; LEE, C. T.; MONTIE, J. E. Bladder cancer in 2010: how far have we come? **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 4, p. 244–272, ago. 2010.

JIANG, Z. G. et al. Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ecto-nucleotidases in human plasma. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 611–618, dez. 2014.

JOHANNESSEN, A. L.; TORP, S. H. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. **Pathology oncology research: POR**, v. 12, n. 3, p. 143–147, 2006.

JUNIOR, N.R.N. **Urologia Prática**. 4. ed. [s.l: s.n.].

KANKURI, M. et al. The association of immunoreactive p53 and Ki-67 with T-stage, grade, occurrence of metastases and survival in renal cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 26, n. 5B, p. 3825–3833, out. 2006.

KILICLI-CAMUR, N. et al. Impact of p53 and Ki-67 in predicting recurrence and progression of superficial (pTa and pT1) urothelial cell carcinomas of urinary bladder. **Pathology International**, v. 52, n. 7, p. 463–469, jul. 2002.

KIM, H. et al. A3 adenosine receptor antagonist, truncated Thio-CI-IB-MECA, induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells. **Anticancer Research**, v. 30, n. 7, p. 2823–2830, jul. 2010.

KLOTZ, L.; BRAUSI, M. A. World Urologic Oncology Federation Bladder Cancer Prevention Program: a global initiative. **Urologic Oncology**, v. 33, n. 1, p. 25–29, jan. 2015.

KNOWLES, M. A.; HURST, C. D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. **Nature Reviews. Cancer**, v. 15, n. 1, p. 25–41, jan. 2015.

KOTWAL, S. et al. Similar treatment outcomes for radical cystectomy and radical radiotherapy in invasive bladder cancer treated at a United Kingdom specialist

treatment center. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 70, n. 2, p. 456–463, 1 fev. 2008.

KRPINA, K. et al. The association between the recurrence of solitary non-muscle invasive bladder cancer and tumor infiltrating lymphocytes. **Croatian Medical Journal**, v. 53, n. 6, p. 598–604, dez. 2012.

KUMAR, ABBAS E ASTER. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. [s.l: s.n.].

KUMAR, V.; CHAPPLE, C. C.; CHESS-WILLIAMS, R. Characteristics of adenosine triphosphate [corrected] release from porcine and human normal bladder. **The Journal of Urology**, v. 172, n. 2, p. 744–747, ago. 2004.

LANGER, D. et al. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. **Cell and Tissue Research**, v. 334, n. 2, p. 199–217, nov. 2008.

LEE, S.-J. et al. Inhibitory effects of the aqueous extract of *Magnolia officinalis* on the responses of human urinary bladder cancer 5637 cells in vitro and mouse urinary bladder tumors induced by N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in vivo. **Phytotherapy research: PTR**, v. 23, n. 1, p. 20–27, jan. 2009.

LIU, Y. et al. In Vitro CRISPR/Cas9 System for Efficient Targeted DNA Editing. **mBio**, v. 6, n. 6, p. e01714–01715, 2015.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 16, n. 3-4, p. 144–153, mar. 2010.

LUDWIG, A. T. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for Bacillus Calmette-Guérin-induced antitumor activity. **Cancer Research**, v. 64, n. 10, p. 3386–3390, 15 maio 2004.

MAHDAVIFAR, N. et al. Epidemiology, Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with the Development Index in the World. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 17, n. 1, p. 381–386, 2016.

MA, L. et al. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 11, p. 2275–2285, 2006.

MALATS, N.; REAL, F. X. Epidemiology of bladder cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 177–189, vii, abr. 2015.

MIKHAILOV, A. et al. CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 181, n. 1, p. 464–475, 1 jul. 2008.

MORI, K. et al. CpG hypermethylation of collagen type I alpha 2 contributes to proliferation and migration activity of human bladder cancer. **International Journal of Oncology**, v. 34, n. 6, p. 1593–1602, jun. 2009.

MUNOZ, A. et al. Removal of urothelium affects bladder contractility and release of ATP but not release of NO in rat urinary bladder. **BMC urology**, v. 10, p. 10, 2010.

MÜNSTEDT, K.; VON GEORGI, R.; FRANKE, F. E. Correlation between MIB1-determined tumor growth fraction and incidence of tumor recurrence in early ovarian carcinomas. **Cancer Investigation**, v. 22, n. 2, p. 185–194, 2004.

OYASU, R. et al. Induction of tumors in heterotopic bladder by topical application of N-methyl-N-nitrosourea and N-butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine. **Cancer Research**, v. 38, n. 9, p. 3019–3025, set. 1978.

PARADA, B. et al. Anti-inflammatory, anti-proliferative and antioxidant profiles of selective cyclooxygenase-2 inhibition as chemoprevention for rat bladder carcinogenesis. **Cancer Biology & Therapy**, v. 8, n. 17, p. 1615–1622, set. 2009.

PARADA, B. et al. Inhibition of bladder tumour growth by sirolimus in an experimental carcinogenesis model. **BJU international**, v. 107, n. 1, p. 135–143, jan. 2011.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 413–492, set. 1998.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, nov. 2013.

REIS, L. O. et al. Urothelial carcinogen resistance driven by stronger Toll-like receptor 2 (TLR2) and Uroplakin III (UP III) defense mechanisms: a new model. **World Journal of Urology**, v. 33, n. 3, p. 413–419, mar. 2015.

ROCKENBACH, L. et al. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urologic Oncology**, v. 31, n. 7, p. 1204–1211, out. 2013.

ROCKENBACH, L. et al. NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 3, p. 421–430, set. 2014.

SADEJ, R.; SPYCHALA, J.; SKLADANOWSKI, A. C. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. **Melanoma Research**, v. 16, n. 3, p. 213–222, jun. 2006.

SÄVE, S.; PERSSON, K. Extracellular ATP and P2Y receptor activation induce a proinflammatory host response in the human urinary tract. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 8, p. 3609–3615, ago. 2010.

SCHWARZER, K. et al. BCG strain S4-Jena: An early BCG strain is capable to reduce the proliferation of bladder cancer cells by induction of apoptosis. **Cancer Cell International**, v. 10, p. 21, 2010.

SERENO, J. et al. Preventive but not curative efficacy of celecoxib on bladder carcinogenesis in a rat model. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 380937, 2010.

SHABBIR, M. et al. Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer. **BJU international**, v. 101, n. 1, p. 106–112, jan. 2008.

SHABBIR, M.; BURNSTOCK, G. Purinergic receptor-mediated effects of adenosine 5'-triphosphate in urological malignant diseases. **International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association**, v. 16, n. 2, p. 143–150, fev. 2009.

SHIBA, M. et al. Ki-67 immunostaining and other prognostic factors including tobacco smoking in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 89, n. 7, p. 1457–1465, 1 out. 2000.

SILVA, M. F. et al. Ionizing radiations induce apoptosis in TRAIL resistant cancer cells: in vivo and in vitro analysis. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 15, n. 5, p. 1905–1907, 2014.

SILVA-RAMOS, M. et al. Impairment of ATP hydrolysis decreases adenosine A1 receptor tonus favoring cholinergic nerve hyperactivity in the obstructed human urinary bladder. **Purinergic Signalling**, v. 11, n. 4, p. 595–606, dez. 2015.

SIMONS, M. P.; O'DONNELL, M. A.; GRIFFITH, T. S. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. **Urologic Oncology**, v. 26, n. 4, p. 341–345, ago. 2008.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 2-3, p. 161–173, set. 2000.

STAGG, J. et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 4, p. 1547–1552, 26 jan. 2010.

STAGG, J. et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. **Cancer Research**, v. 71, n. 8, p. 2892–2900, 15 abr. 2011.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 39, p. 5346–5358, 30 set. 2010.

STELLA, J. et al. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. **Urologic Oncology**, v. 28, n. 3, p. 260–267, jun. 2010.

STUART-HARRIS, R. et al. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 17, n. 4, p. 323–334, ago. 2008.

SWELLAM, T. et al. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. **International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association**, v. 10, n. 4, p. 213–219, abr. 2003.

SYED, S. K. et al. Ectonucleotidase NTPDase3 is abundant in pancreatic β -cells and regulates glucose-induced insulin secretion. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 10, p. E1319–1326, 15 nov. 2013.

TAN, P.-H. et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. **Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 18, n. 3, p. 374–381, mar. 2005.

TRUSCHEL, S. T. et al. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 3, p. 830–846, mar. 2002.

UJHÁZY, P. et al. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. **International Journal of Cancer**, v. 68, n. 4, p. 493–500, 15 nov. 1996.

VUADEN, F. C. et al. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. **Life Sciences**, v. 80, n. 19, p. 1784–1791, 17 abr. 2007.

WALLACE, D. M. Occupational urothelial cancer. **British Journal of Urology**, v. 61, n. 3, p. 175–182, mar. 1988.

WANG, E. C. Y. et al. ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2412–2422, set. 2005.

WANG, L. et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, n. 3, p. 365–372, mar. 2008.

WACHSTEIN M, MEISEL E. A comparative study of enzymatic staining reactions in the rat kidney with necrobiosis induced by ischemia and nephrotoxic agents (mercuhydrin and DL-serine). **J Histochem Cytochem**. V. 5, n.3, p. 204-220. 1957.

WETTSTEIN, M. S. et al. CD73 Predicts Favorable Prognosis in Patients with Nonmuscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer. **Disease Markers**, v. 2015, p. 785461, 2015.

WHITE-GILBERTSON, S. J. et al. Oxidative stress sensitizes bladder cancer cells to TRAIL mediated apoptosis by down-regulating anti-apoptotic proteins. **The Journal of Urology**, v. 182, n. 3, p. 1178–1185, set. 2009.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 4, p. 211–217, abr. 2006.

WILLIAMS, P. D.; LEE, J. K.; THEODORESCU, D. Molecular credentialing of rodent bladder carcinogenesis models. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 8, p. 838–846, ago. 2008.

WU, X.-R. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 9, p. 713–725, set. 2005.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, maio 2008.

YOHN, N. L. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase, mTOR, and glycogen synthase kinase-3 β mediated regulation of p21 in human urothelial carcinoma cells. **BMC urology**, v. 11, p. 19, 2011.

YU, W. et al. Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 291, n. 2, p. C254–265, ago. 2006.

YU, W.; ROBSON, S. C.; HILL, W. G. Expression and distribution of ectonucleotidases in mouse urinary bladder. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e18704, 2011.

ZHANG, B. CD73 promotes tumor growth and metastasis. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 1, p. 67–70, 1 jan. 2012.

ZHANG, Q. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e50946, 2012.

ZHI, X. et al. RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 24, n. 6, p. 439–448, 2007.

ZHOU, P. et al. Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. **Cancer Biology & Therapy**, v. 6, n. 3, p. 426–431, mar. 2007.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **The Biochemical Journal**, v. 285 (Pt 2), p. 345–365, 15 jul. 1992.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4-5, p. 299–309, nov. 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases in the nervous system. **Novartis Foundation Symposium**, v. 276, p. 113–128; discussion 128–130, 233–237, 275–281, 2006.

