



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS CHAPECÓ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

**CAROLINA MACHADO EISENHUT**

**CHAPECÓ - SC  
2024**

**CAROLINA MACHADO EISENHUT**

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Chapecó, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Zanini  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sarah F. V. O. Maciel

**CHAPECÓ - SC  
2024**

## UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Chapecó, SC - Brasil  
Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar  
Caixa Postal 181  
CEP 89815- 899

### Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Eisenhut, Carolina Machado  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA  
PURINÉRGICO E DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM  
PACIENTES COM CÂNCER DE BEXIGA NÃO INVASIVO / Carolina  
Machado Eisenhut. -- 2024.  
49 f.:il.

Orientadora: Doutora em Ciências Biológicas Daniela  
Zanini

Co-orientadora: Doutora em Ciências Biológicas Sarah  
F. V. O. Maciel

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biomédicas, Chapecó, SC, 2024.

1. Câncer de Bexiga; Sinalização Purinérgicas;  
Ectonucléotidases; Inflamação.. I. Zanini, Daniela,  
orient. II. Maciel, Sarah F. V. O., co-orient. III.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**CAROLINA MACHADO EISENHUT**

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, da Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, defendido em Banca Examinadora em 14/08/2024

Aprovado em: 14/08/2024

**BANCA EXAMINADORA**

*Daniela Zanini*

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Zanini - UFFS  
(Orientadora)

*Debora T.R. Silva*

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Tavares de Resende e Silva  
(Avaliador Membro Interno)

*Vander Monteiro da Conceição*

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Vander Monteiro da Conceição  
(Avaliador Membro Externo)

Chapecó/SC, Agosto de 2024.

## AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar que está sempre conosco, dando força, iluminando e presenteando a nós com sua sabedoria eterna, possibilitando que seja ampliada nossa mente à novos conhecimentos.

À minha família que sempre me apoiou, dando força nos diversos momentos da minha vida, incentivando sempre a ser melhor, a minha querida e amada mãe profissional e enfermeira incrível que sempre me incentivou a ser A melhor! Ao meu querido e amado pai, que está sempre me incentivando a crescer no caráter e educação.

Agradeço também a minha melhor amiga bióloga Marisa, que me incentiva a exercitar minhas células, gânglios neuronais. Sempre dizendo: “Vamos ativar esse fosfato!

Ao meu amor Antonio, por estar ao meu lado, dando força com os meus estudos, cuidando de mim, me abraçando, incentivando e dizendo repetidas vezes “a mulher incrível que sou”!

Assim como meus cachorros Oliver e Theo, que aqueciam os meus pés nos momentos de digitação deste trabalho durante o mestrado, nunca me deixando só.

A professora Dra. Daniela Zanini, me presenteando com a oportunidade de conhecer um sistema tão complexo como o purinérgico, orientadora que me ajudou a alcançar este objetivo que foi o mestrado em ciências biomedicas, mulher de garra, de uma generosidade e coração gigantesco, gratidão por estar junto a mim!

A professora Dra. Sarah Franco, por participar dessa busca e fazer com que a Universidade Federal Fronteira Sul tenha um projeto tão magnífico como este, e uma equipe tão especial como os professoras desse programa de mestrado.

Ao Professor e Doutor Vander Monteiro da Conceição, que me incentivou a fazer o mestrado, me acompanhou nessa jornada de estudos, agradeço a generosidade, o carinho, atenção que sempre forneceu quando precisei, você é incrível, tenho muita honra em te conhecer.

A professora Déborah por fazer parte desse processo, sendo essencial para avaliação e validação desse momento de especialização.

Assim também aos pacientes que participaram da pesquisa sempre dispostos a contribuir para evolução da pesquisa contra o câncer, aprimorando os tratamentos já existentes até atingirmos o patamar da curabilidade.

Agradeço as instituições envolvidas a disponibilizar os espaços e a demanda de estudo, Hospital Regional do Oeste e Universidade Federal da Fronteira Sul, redes de apoio como a Cidade do idoso, espero que este trabalho contribua para melhoria da saúde da comunidade.

*Quanto mais complexo o todo, mais dependemos da divisão de conhecimentos entre indivíduos cujos esforços separados são coordenados pelo mecanismo impessoal, transmissor dessas importantes informações, que denominamos sistema ~~de~~ preços (Purinérgico).*

*Friedrich Hayek*

## RESUMO

Segundo dados mundiais, o Câncer de Bexiga (CaB) é o sexto tipo tumoral mais incidente e letal na população masculina. Sua ocorrência associa-se especialmente ao tabagismo, tendo um perfil de morbimortalidade preocupante no que diz respeito à saúde pública, inclusive no Brasil. Os processos inflamatórios e a sinalização purinérgica podem influenciar diretamente a carcinogênese da bexiga, assim como a progressão tumoral. A ação enzimática das ectonucleotidases e a resposta dos tecidos aos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina assumem um papel especial e devem ser cada vez mais explorados. Considerando essa inter-relação com o CaB, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das enzimas do sistema purinérgico em pacientes com CaB não invasivo, bem como os níveis de alguns biomarcadores inflamatórios nesses pacientes. Trata-se de um estudo caracterizado como quantitativo observacional transversal. As amostras de plaquetas, soro e plasma utilizadas foram coletadas por punção venosa (30 mL de sangue) de 29 pacientes com diagnóstico de CaB, anteriormente ao início de qualquer intervenção terapêutica, e 36 indivíduos controle, de faixa etária semelhante ao grupo de pacientes. Foram avaliadas as atividades das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e Adenosina Deaminase (ADA), assim como os níveis séricos de IL-4, IL-6 e IL-10. A coleta do material biológico dos pacientes foi realizada nas dependências do Hospital Regional do Oeste, localizado em Chapecó/SC. As informações clinicopatológicas dos pacientes foram obtidas a partir dos prontuários médicos. Para as análises estatísticas, primeiramente, os dados foram testados quanto a sua normalidade aplicado-se o teste de *Shapiro-Wilk*. Após, foi utilizado o Teste *t de Student* e *ANOVA One-way*. O nível de significância utilizado foi de 0,05 e o programa estatístico utilizado foi o *GraphPad Prism 8.0.1*. Os pacientes envolvidos no estudo apresentaram média de idade de 69 anos e quanto ao estadiamento clínico do CaB, 18 (62,06%) foram classificados no Estadiamento 0 e 11 (37,94%) no Estadiamento 1. A atividade da E-NTPDase, para a hidrólise do ATP e ADP, assim como a atividade da E-5'-nucleotidase, para a hidrólise de AMP, está significativamente aumentada em pacientes com Estadiamento 0 e I, quando comparado com o grupo controle. Sobre a ADA, a atividade está substancialmente diminuída no Estadiamento 0 e Estadiamento I, comparando-se ao grupo controle. Os níveis plasmáticos de IL-10, IL-6 e IL-4 foram maiores em pacientes com CaB não invasivo, em comparação com o grupo controle. O CaB mostrou-se como um dos tumores mais comuns e letais, principalmente entre homens com idade avançada e tabagistas. A presença tumoral favorece o aumento dos níveis extracelulares de ATP, ativando a cascata de enzimas que é responsável pela hidrólise desse nucleotídeo e de seus produtos. A superativação da E-NTPDase e da E-5'-nucleotidase estão associadas a um pior prognóstico para o CaB, do mesmo modo que a menor atividade da ADA favorece o acúmulo de adenosina (Ado) no organismo, importante molécula imunossupressora que facilita o escape das células tumorais da vigilância do sistema imune. Além disso, pacientes com CaB não invasivo apresentam níveis elevados de IL-4, IL-6 e IL-10, moléculas que se relacionam com o desenvolvimento e a metastização de tumores, além do tabagismo, fator que contribui enormemente para a incidência de CaB. Os resultados mostraram que o CaB altera diretamente a atividade das enzimas do sistema purinérgico e marcadores inflamatórios séricos. Esses achados contribuem para uma melhor compreensão da sinalização purinérgica e dos processos inflamatórios na fisiopatologia do CaB, tornando-se uma ferramenta importante para acompanhamento e terapêutica desses pacientes.

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

## ABSTRACT

According to global data, bladder cancer (BC) is the sixth most common and lethal type of tumor in the male population. Its occurrence is particularly associated with smoking, presenting a concerning morbidity and mortality profile in terms of public health, including in Brazil. Inflammatory processes and purinergic signaling can directly influence bladder carcinogenesis as well as tumor progression. The enzymatic action of ectonucleotidases and the tissue response to adenine nucleotides and nucleosides play a significant role and should be increasingly explored. Considering this interrelation with BC, the present study aimed to evaluate the activity of purinergic system enzymes in patients with non-invasive BC and the levels of some inflammatory biomarkers in these patients. This study is characterized as a quantitative, cross-sectional observational study. Platelet, serum, and plasma samples were collected through venipuncture (30 mL of blood) from 29 patients diagnosed with BC, before the initiation of any therapeutic intervention, and from 36 control individuals of a similar age group. The activities of the enzymes E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, and Adenosine Deaminase (ADA) were evaluated, as well as the serum levels of IL-4, IL-6, and IL-10. The collection of biological material from the patients was carried out at the facilities of the Regional Hospital of the West, located in Chapecó/SC. Clinicopathological information from the patients was obtained from medical records. For statistical analyses, the data were first tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Subsequently, Student's t-test and One-way ANOVA were applied. The significance level used was 0.05, and the statistical program used was GraphPad Prism 8.0.1. The patients involved in the study had a mean age of 69 years, and regarding the clinical staging of BC, 18 (62.06%) were classified as Stage 0 and 11 (37.94%) as Stage 1. E-NTPDase activity for ATP and ADP hydrolysis, as well as E-5'-nucleotidase activity for AMP hydrolysis, was significantly increased in patients with Stage 0 and Stage 1 compared to the control group. Regarding ADA, its activity was substantially decreased in Stage 0 and Stage 1 compared to the control group. Plasma levels of IL-10, IL-6, and IL-4 were higher in patients with non-invasive BC compared to the control group. BC was shown to be one of the most common and lethal tumors, particularly among older male smokers. Tumor presence favors an increase in extracellular ATP levels, activating the cascade of enzymes responsible for the hydrolysis of this nucleotide and its products. The overactivation of E-NTPDase and E-5'-nucleotidase is associated with a poorer prognosis for BC, just as lower ADA activity favors the accumulation of adenosine (Ado) in the body, an important immunosuppressive molecule that facilitates the escape of tumor cells from immune surveillance. Moreover, patients with non-invasive BC present elevated levels of IL-4, IL-6, and IL-10, molecules related to tumor development and metastasis, in addition to smoking, a factor that greatly contributes to BC incidence. The results showed that BC directly alters the activity of purinergic system enzymes and serum inflammatory markers. These findings contribute to a better understanding of purinergic signaling and inflammatory processes in BC pathophysiology, becoming an important tool for monitoring and treating these patients.

**Keywords:** Bladder Cancer; Purinergic Signaling; Ectonucleotidases; Inflammation.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estadiamento clínico do Câncer de Bexiga .....	19
FIGURA 2 - Componentes da sinalização purinérgica .....	20
FIGURA 3 - Atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e ADA em pacientes com CaB com estadiamento clínico 0 e I .....	30
FIGURA 4 - Níveis plasmáticos de IL em pacientes com CaB .....	31

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 - Classificação TNM do Câncer de Bexiga pela UIC .....	17
QUADRO 2 - Câncer de Bexiga estadiamento TNM AJCC UICC 8ª edição .....	18

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Características gerais dos pacientes e controles e estadiamento em pacientes .. 28

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	Adenosina deaminase
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
ADK	Adenosina quinase
AJCC	<i>American Joint Committe on Cancer</i>
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CaB	Câncer de Bexiga
CaCl	Cloreto de cálcio
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID	Classificação Internacional de Doenças
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Danos
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
E-5'Nucleotidase/CD73	Ecto 5'-nucleotidase
E-NTPDase/ CD39	Ecto-Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
fL	Fentolitro
HCL	Ácido Clorídrico
HRO	Hospital Regional do Oeste
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
KCL	Cloreto de potássio
MIBC	<i>Muscle-Invasive Bladder Cancer</i>
mm	Milímetro
MgCl	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NaCL	Cloreto de Sódio
NMIBC	<i>Non-Muscle Invasive Bladder Cance</i>

NK	Natural Killer
PI3K	Fosfoinosítídea 3-quinase
pH	Potencial Hidrogênico
PRP	Plasma rico em plaquetas
RTU	Ressecção Transuretral
SC	Santa Catarina
TCA	Ácido tricloroacético
TCD	T Citotóxicas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF	Fator de Crescimento Transformador
Th	T helper
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
U/L	Unidade por litro
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UIC	Unidade de Informação de Câncer
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VEFG	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<u>2.1 OBJETIVO GERAL.....</u>	14
<u>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</u>	14
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<u>3.1 CÂNCER DE BEXIGA .....</u>	15
<u>3.2 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA, INFLAMAÇÃO E CÂNCER DE BEXIGA.....</u>	19
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
<u>4.1 DESENHO DO ESTUDO .....</u>	24
<u>4.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES .....</u>	24
<u>4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....</u>	25
<u>4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....</u>	25
<u>4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....</u>	25
<u>4.5.1 Coleta e processamento das amostras biológicas.....</u>	25
<u>4.5.2 Dosagem de proteínas.....</u>	25
<u>4.5.3 Determinação da atividade da E-NTPDase e da E-5'-nucleotidase.....</u>	26
<u>4.5.4 Determinação da atividade da ADA .....</u>	26
<u>4.5.5 Quantificação de Interleucinas plasmáticas.....</u>	26
<u>4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</u>	27
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<u>5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....</u>	27
<u>5.2 ATIVIDADE DA E-NTPDASE, E-5'-NUCLEOTIDASE E ADA.....</u>	28
<u>5.3 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-10, IL-6 E IL-4 .....</u>	30
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com os dados publicados pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em 2022, mundialmente o Câncer de Bexiga (CaB) é o sexto tipo tumoral mais incidente em homens, além de ser a segunda neoplasia que mais acomete o sistema geniturinário (GLOBOCAN, 2022). No cenário nacional, o número de novos casos estimados de CaB para cada ano do triênio 2023-2025 é superior a 11 mil, sendo, aproximadamente, 8 mil casos entre os homens e 3.500 entre as mulheres (INCA, 2023)

Idade avançada, sexo masculino e tabagismo contribuem para o desenvolvimento do CaB. A literatura tem destacado que o tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CaB, uma vez que mesmo após um período superior a 20 anos da cessação do consumo de cigarros, os seus efeitos nocivos ainda causam prejuízos à saúde de ex-fumantes (THUN *et al.*, 2017; INCA, 2023). Desse modo, o tabagismo está fortemente associado com o desenvolvimento do CaB, sendo fator comum em mais de 50% dos indivíduos com esse diagnóstico, uma vez que ele proporciona o aumentando de até quatro vezes a probabilidade de desenvolvimento dessa neoplasia em indivíduos fumantes, quando comparados aos não-fumantes (THUN *et al.*, 2017; INCA, 2023). Aliado ao tabagismo, assim como em outros cânceres, a idade também é um fator de risco importante para a ocorrência tumoral, dada a incidência aumentada de CaB após a sexta década de vida (GLOBOCAN, 2022).

A maioria dos CaB apresentam-se como doença “superficial”, confinada à mucosa da bexiga ou camada submucosa, sem invasão muscular (ADINOLFI, 2017). Os tumores superficiais consistem em tumores papilares restritos à mucosa, tumores papilares ou sésseis que se estendem até a lâmina própria e carcinoma *in situ* (ALIAGAS *et al.*; 2014). É importante destacar que a história natural desses subtipos patológicos difere significativamente, uma vez que enquanto a maioria dos tumores superficiais (60% a 70%) apresentam baixo risco e têm propensão à recorrência após ressecção transuretral, alguns deles (15% a 25%) apresentam alto risco de progressão para invasão muscular – dando origem aos CaB músculo invasivos (ALIAGAS *et al.*; 2014; ADINOLFI, 2017).

Apesar de algumas evidências já terem sido estabelecidas sobre a fisiopatologia do CaB, a investigação e a compreensão dos mecanismos celulares que contribuem para o desenvolvimento dessa doença são de grande interesse para a comunidade médica (VAGHARI-TABARI *et al.*, 2021).

A literatura científica descreve que as células tumorigênicas apresentam significativas alterações em vias de sinalização que regulam suas atividades, modificando aspectos associados

ao crescimento, proliferação e apoptose celular, favorecendo a invasividade dessas células e, consequentemente, a ocorrência de metástases (VAGHARI-TABARI *et al.*, 2021). Nesse cenário a sinalização purinérgica ganha destaque, com os estudos atuais demonstrando uma estreita relação entre o desenvolvimento de processos inflamatórios, a iniciação e a progressão tumoral, assim como o acúmulo sérico de adenosina (Ado) e suas concentrações no microambiente tumoral (KEPP *et al.*, 2021; YEGUTKIN; BOISON, 2022).

Diante disso e considerando que: a) o CaB é um problema de saúde pública mundialmente associado a altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade; b) a sinalização purinérgica está envolvida nos processos tumorigênicos; c) há poucos estudos que visam esclarecer o papel do sistema purinérgico no CaB, entendemos que a exploração das vias comuns que associam a desregulação da sinalização purinérgica e os processos inflamatórios no cenário das doenças urológicas pode, em última análise, auxiliar na obtenção de novas percepções mecanicistas dos processos da doença e no direcionamento terapêutico no CaB.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e Adenosina Deaminase (ADA), e dosar os níveis de interleucinas plasmáticas em pacientes com CaB em diferentes estadiamentos da doença.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar a caracterização clínico-patológica do grupo amostral;
- Analisar a atividade da E-NTPDase em plaquetas de pacientes com diagnóstico de CaB em diferentes estadiamentos e em indivíduos controle;
- Verificar a atividade da E-5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com diagnóstico de CaB em diferentes estadiamentos e em indivíduos controle;
- Avaliar a atividade da ADA em soro de pacientes com diagnóstico de CaB em diferentes estadiamentos e em indivíduos controle;
- Dosar os níveis plasmáticos de IL-10, IL-6 e IL-4 em pacientes com diagnóstico de CaB e em indivíduos controle.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CÂNCER DE BEXIGA

Em todo o mundo o CaB foi responsável por 220 mil mortes no ano de 2022, acometendo especialmente a população masculina, na qual é o nono câncer mais letal (GLOBOCAN, 2022).

Nessa conjectura, a maioria dos casos de CaB estão associados a fatores de risco externos. Indo ao encontro dessa informação, a IARC avaliou os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CaB, relacionando: i) tabagismo; ii) exposição a produtos com potencial cancerígeno (produção de alumínio e borracha); iii) exposição ambiental à radiação X, gama ou arsênio; iv) uso de medicamentos como ciclofosfamida e clornafazina e; v) infecção por *Schistosoma hematobium* (JUBBER *et al.*, 2023).

O CaB tem sua iniciação a partir de mutações de células endoteliais, desencadeadas especialmente pelo contato com agentes carcinogênicos - a exemplo daqueles presentes no cigarro (CONTE, 2021). Esse tumor pode ser detectado acidentalmente ou em consequência de seus sinais e sintomas, tais como hematúria, polaciúria, disúria, mudança de coloração da urina e dores na região dos rins e pélvica (FERLAY *et al.*, 2020, SUNG *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o conhecimento sobre o estadiamento clínico da doença é de fundamental importância, uma vez que o estágio do tumor indica não apenas o crescimento e a extensão da doença, mas também o tipo de tumor e sua interação com o hospedeiro. Dessa forma, a classificação do CaB em grupos considera a localização, o tamanho ou volume do tumor, a invasão direta e linfática, as metástases à distância, o diagnóstico histopatológico, a produção de substâncias, as manifestações sistêmicas, a duração dos sinais e sintomas, o sexo e a idade do paciente (SUNG *et al.*, 2021).

Assim, podemos inicialmente diferir o CaB em dois tipos, sendo: i) muscular invasivo (MIBC), no qual existe a maior propensão à disseminação e invasão de camadas musculares e profundas de outros órgãos, surgindo como uma área plana do epitélio composta por células anaplásicas com um padrão de crescimento desordenado, sem extensão ao lúmen da bexiga ou extensão na membrana basal e; ii) não-musculo invasivo (NMIBC), que são aqueles que se apresentam apenas na camada interna de células do epitélio transicional (MATULEWICZ; STEINBERG, 2020), responsáveis por 75% dos casos de CaB. Vale destacar que essa diferença quantitativa em relação à incidência dos tipos de CaB justifica-se especialmente pelo contato

direto do urotélio com a urina armazenada na bexiga, que pode conter agentes nocivos e cancerígenos proveniente do metabolismo (CATTO *et al.*, 2021).

Ainda, os carcinomas de células escamosas e os adenocarcinomas demonstra menor incidência dos casos de CaB (entre 3 e 7%, e menos de 2%, respectivamente), sendo costumeiramente associados à irritação crônica do epitélio por cálculos, ao uso de cateter vesical permanente, aos processos de infecção urinária ou a infecção crônica por *Schistosoma hematobium* (JUBBER *et al.*, 2023).

É essencial destacar que os fragmentos teciduais devem ser avaliados e classificados. Para isso, o sistema de estadiamento mais amplamente referenciado é proposto pela UICC, conhecido como Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Esse sistema se baseia na extensão anatômica da doença, considerando as características do tumor primário (T), dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão afetado (N) e da presença ou ausência de metástases à distância (M) (PARK *et al.*, 2014). Esses parâmetros geralmente são graduados de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. Além das graduações numéricas, podem ser subdivididas em graduações alfabéticas as categorias T e N (a, b, c). Assim, tanto as graduações numéricas quanto as alfabéticas expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos (INCA, 2023).

Nesse contexto, para que seja possível determinar o estadiamento histopatológico do CaB, é fundamental que se avalie principalmente a profundidade da invasão tumoral na parede vesical (estágio T), bem como se realize a ressecção transurretral (RTU) do tumor por via endoscópica. Importante frisar que, conforme o Quadro 1, os Estadiamentos 0 e I fazem parte dos NMIBC, e os Estadiamentos II, III e IV estão associados à MIBC (PARK *et al.*, 2014). Dessa maneira, expomos no Quadro 1 e Quadro 2 a classificação TNM e os estadiamentos para o CaB propostos pela UICC (2002).

Quadro 1 - Classificação TNM do Câncer de Bexiga pela UIC

<b>T</b>	<b>Tumor Primário</b>
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilífero não-invasivo
Tis	Carcinoma in situ: “tumor plano”
T1	Tumor invade a lâmina própria (tecido conjuntivo subepitelial)
T2	Tumor invade musculatura própria
pT2a	Tumor invade a musculatura superficial (metade interna)
pT2b	Tumor invade musculatura profunda (metade externa)
T3	Tumor invade tecido perivesical
pT3a	Microscopicamente
pT3b	Macroscopicamente (massa extravesical)
T4	Tumor que invade qualquer um dos seguintes: estroma prostático, vesículas seminais, útero, vagina, parede pélvica ou parede abdominal
T4a	Tumor que invade diretamente o estroma prostático, vesículas seminais, útero, vagina
T4b	Tumor que invade parede pélvica, parede abdominal
<b>N</b>	<b>Linfonodos regionais</b>
NX	Os linfonodos não podem ser avaliados
N0	Sem metástase linfonodal
N1	Metástase de linfonodo regional único na pelve verdadeira (perivesical, obturador, ilíaco interno e externo ou linfonodo sacral)
N2	Metástases linfográficas regionais múltiplas na pélvis verdadeira (perivesical, obturador, ilíaco interno e externo ou metástase linfonodal sacral)
N3	Metástase dos linfonodos para os linfonodos ilíacos comuns
<b>M</b>	<b>Metástase a distância</b>
M0	Sem metástases a distância
M1	Metástase distante
M1a	Metástase distante limitada a gânglios linfáticos além dos ilíacos comuns
M1b	Metástases distantes não linfônicas

Fonte: adaptado de Amin (2017)

Quadro 2 - Câncer de Bexiga estadiamento TNM AJCC UICC 8ª edição

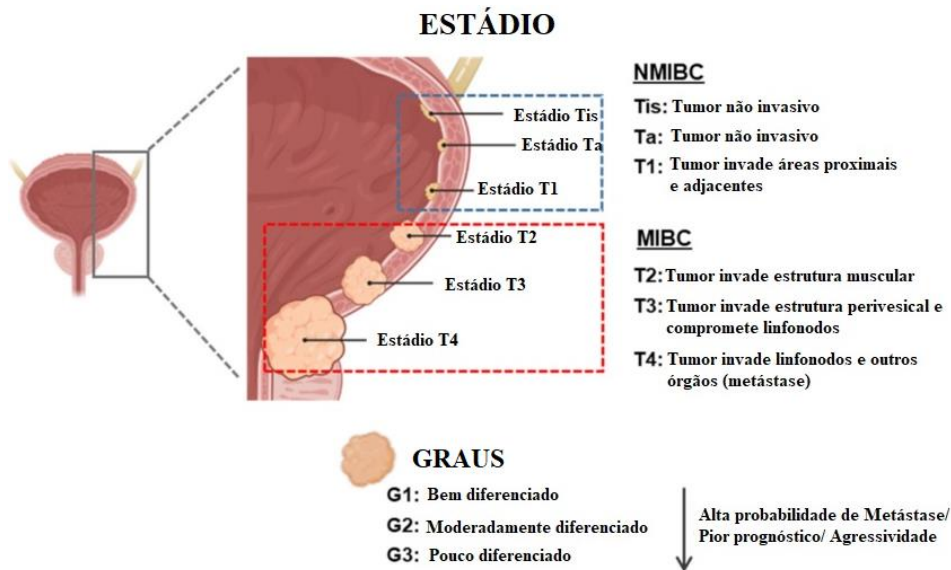
<b>Estadiamento</b>	<b>T - Tumor Primário</b>	<b>N - Linfonodos regionais</b>	<b>M - Metástase a distância</b>
Estádio 0a	Ta	N0	M0
Estádio 0is	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2a, b	N0	M0
Estádio III A	T3a, T3b, T4a	N0	M0
Estádio III A	T1-T4a	N1	M0
Estádio III B	T1-T4a	N2, N3	M0
Estádio IV A	T4b	Qualquer N	M0
Estádio IV A	Qualquer T	Qualquer N	M1a
Estádio IV B	Qualquer T	Qualquer N	M1b

Fonte: AJCC *Cancer Staging Manual, Eighth Edition* (2017) published by Springer International Publishing. Corrected at 4th printing (2018).

Em relação à classificação, a mais utilizada na literatura foi proposta pela World Health Organization (WHO) em parceria com a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP), no qual separa em grau histológico os parâmetros clínico-histológicos dos tumores, subdividindo o CaB conforme o grau e histologia em: grau 1 – carcinoma urotelial papilífero de baixo grau e graus 2 e 3 – carcinoma papilífero de alto grau (ZERATI FILHO; NARDOZZA JÚNIOR; REIS, 2010).

Para melhor compreender todos os aspectos considerados na avaliação da gravidade do CaB, a Figura 1 ilustra o grau de comprometimento e invasividade celular nos MIBC e NMIBC, as classificações em relação ao tamanho do tumor, os diferentes estadiamentos do CaB e os graus de diferenciação celular desse neoplasia.

Figura 1 - Estadiamento clínico do Câncer de Bexiga



Fonte: Adaptado de AJCC *Cancer Staging Manual, Eighth Edition* (2017).

Em relação à sobrevida dos pacientes com diagnóstico de CaB, os dados do *National Cancer Institute*, em 2022, apontaram taxas de sobrevida para 5 anos na faixa de 76%. Contudo, esses percentuais se relacionam diretamente com o estadiamento da doença, podendo ser de 50% para carcinomas *in situ*, 34% para câncer localizado (confinado a sítio primário) e de apenas de 5% para tumores metastatizados. Esses dados deixam claro que o estágio do CaB, no momento do diagnóstico, influencia sobremaneira a conduta terapêutica a ser recomendada (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2022).

### 3.2 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA, INFLAMAÇÃO E CÂNCER DE BEXIGA

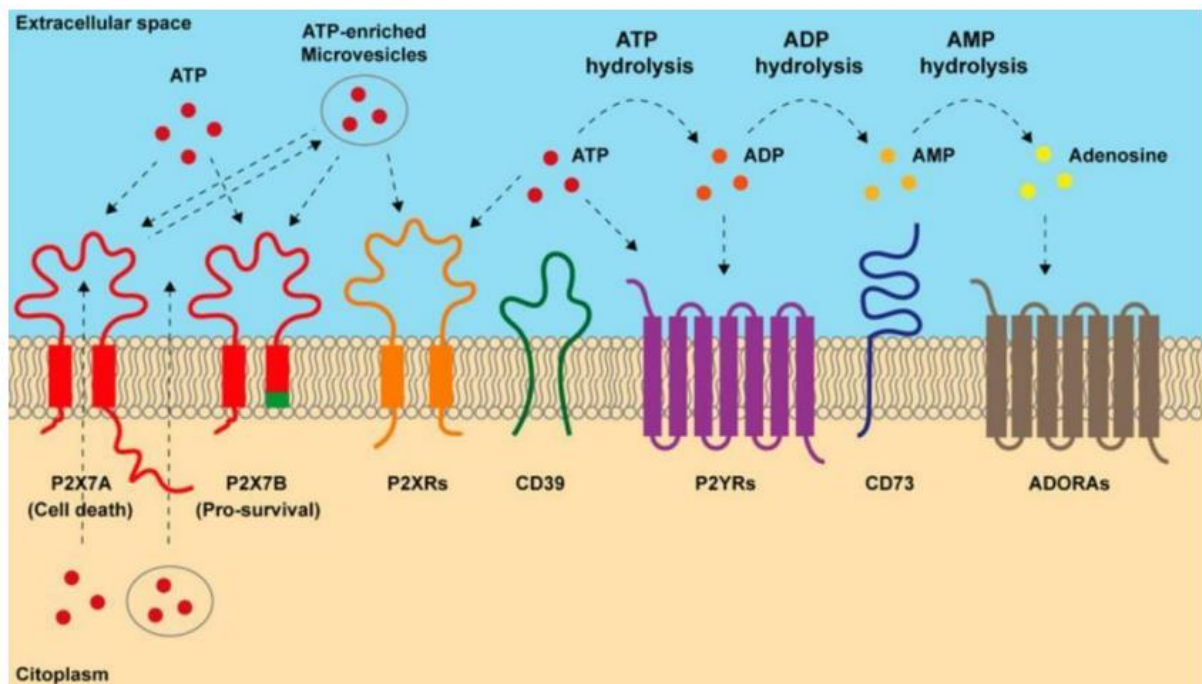
A sinalização purinérgica vem ganhando cada vez mais destaque no meio médico científico, uma vez que estudos atuais têm demonstrando uma estreita relação entre o desenvolvimento de neoplasias, os eventos associados à progressão tumoral e os níveis de nucleotídeos de adenina e adenosina (Ado) séricos, bem como suas concentrações no microambiente tumoral (KEPP *et al.*, 2021; YEGUTKIN; BOISON, 2022).

Outrossim, as quantidades de adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e Ado no meio extracelular estão diretamente relacionadas à atividade de enzimas que hidrolisam essas moléculas. Entre essas enzimas, destacam-se: i) Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase/CD39), que hidrolisa ATP em ADP e ADP em AMP; ii) E-5'-nucleotidase (CD73), que hidrolisa AMP em Ado; e iii) adenosina

desaminase (ADA), que converte Ado em inosina. Tanto a CD39 quanto a CD73 estão expressas em diferentes células e tecidos, com CD39 sendo abundantemente expressa nas células endoteliais, células musculares lisas, células dendríticas, linfócitos e plaquetas, enquanto a CD73 é expressa no cólon, rim, cérebro, fígado, coração, pulmão e próstata (MORIWAKI *et al.*, 1999; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

Ademais, no complexo sistema de sinalização purinérgica, há de se destacar a importância dos receptores purinérgicos pertencentes às famílias: a) P1: (A<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>); e b) P2 (P2X<sub>1-7</sub> e P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 12, 14</sub>) (DI VIRGILIO, 2012). A fim de caracterizar os elementos envolvidos no sistema purinérgico, apresentamos a Figura 2.

Figura 2 - Componentes da sinalização purinérgica



Fonte: Adaptado de de Zanoni (2022).

**Figura 2** - Componentes da sinalização purinérgica. O ATP é liberado no espaço extracelular, atuando nos receptores P2X e P2Y. No meio extracelular o ATP pode ser hidrolisado pela CD39 e CD73 em ADP, AMP e Ado. A Ado pode ser posteriormente hidrolisada em inosina pela ADA.

Desse modo, vale destacar que os sinalizadores extracelulares, especialmente ATP, ADP e Ado, participam de diferentes processos fisiopatológicos, como: a estímulo ou a inibição da apoptose; a proliferação, a migração e a diferenciação celular; e a secreção de fatores de crescimento e os mediadores inflamatórios. Assim, processos patológicos como o câncer podem ser modulados pelo sistema purinérgico (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

Nesse contexto, muitos estudos demonstraram o efeito da sinalização purinérgica sobre o crescimento celular, sendo o ATP fortemente envolvido, tanto no metabolismo das células neoplásicas, quanto na imunidade antitumoral (DI VIRGILIO, 2012; KEPP *et al.*, 2021; YEGUTKIN; BOISON, 2022). Nessa conjectura, o ATP pode ser liberado das células por vias específicas e inespecíficas, uma vez que a liberação não regulada ocorre a partir de células mortas e danificadas, enquanto a liberação ativa envolve grânulos exocíticos, microvesículas derivadas da membrana plasmática, dos transportadores específicos de cassete de ligação ao ATP e dos canais de membrana, dos moduladores da homeostase do cálcio 1, dos canais aniônicos regulados por volume e dos canais maxi-ânion (VULTAGGIO-POMA; SARTI; DI VIRGILIO, 2020).

Atrelado a isso, os eventos associados às etapas de proliferação de células tumorais geram um microambiente inflamatório, favorável à liberação de Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), visto que na tumorigênese há um processo dinâmico entre proliferação e lesão/destruição celular (DI VIRGILIO; SARTI; COUTINHO, 2020). Nesse contexto, um desses DAMPs é o ATP, que desempenha papel crucial na ativação de células inflamatórias nas doenças neoplásicas, tornando-se um importante componente da sinalização purinérgica envolvido no desenvolvimento e na progressão de neoplasias (DI VIRGILIO, 2012).

Durante o processo inflamatório, o ATP exerce uma série de efeitos, estando envolvido no desenvolvimento da inflamação por meio de ações, como: i) a liberação de histaminas de mastócitos; ii) o aumento da síntese de prostaglandinas; e iii) a produção e liberação de citocinas por células do sistema imune (DI VIRGILIO *et al.*, 1998; BURNSTOCK, 2002; BULANOVA *et al.*, 2005;). As ações do ATP na inflamação ocorrem principalmente por meio da via ativação do receptor purinérgico P2X7, provocando apoptose celular e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-10, IL-6 e IL-4. Desse modo, o ATP, um dos principais componentes bioquímicos do microambiente tumoral, pode favorecer tanto a progressão, quanto a supressão tumoral, dependendo da sua concentração e da ação das ecto-nucleotidases e dos receptores específicos expressos por células imunes e cancerígenas (PELEGRIN & SURPRENANT, 2009; FRANCO *et al.*, 2015; KUMARI *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2019).

Ademais, compreende-se que a Ado é um biomarcador de dano celular que medeia ações anti-inflamatórias, sendo uma potente molécula imunossupressora. A Ado normalmente está presente em níveis elevados durante o desenvolvimento de tumores e é capaz de induzir o crescimento e desenvolvimento das células cancerosas através de mecanismos como a indução de angiogênese e do estado imunossuprimido (MALDONADO *et al.*, 2012). Nesse contexto,

estudos mostraram que o acúmulo de Ado contribui para a progressão tumoral, representando um promissor alvo imunoterapêutico, uma vez que este nucleosídeo prejudica a função efetora das células T. De forma controversa, a Ado também induz a apoptose, e nesse sentido, a inibição de ADA seria considerada uma estratégia antitumoral (MASTELICGAVILLE *et al.*, 2019; CAMICI *et al.*, 2019).

Adicionalmente, a ação da CD39 se mostra um relevante mediador da progressão tumoral, uma vez que ela pode desempenhar papel imunossupressor indireto ao hidrolisar o ATP e ADP, que serão posteriormente convertidos em Ado - molécula que induz a progressão de tumores (KÜNZLI *et al.*, 2011; MASSÉ *et al.*, 2015). Em relação à CD73, ela está associada a um importante papel de regulação do fluxo sanguíneo e trombogênese, devido aos mecanismos de hidrólise de AMP em Ado (ROCKENBACH *et al.*, 2014; HALLIWELL, 2015; JUBBER *et al.*, 2023).

Já foi descrito que a CD73 é altamente expressa na maioria dos tumores sólidos, sendo proposta como um potencial biomarcador clínico ou prognóstico (DIETRICH *et al.*, 2016; CARDOSO *et al.*, 2022) além de ser considerada a principal produtora de adenosina extracelular (BURNSTOCK, 2006). Além disto, está positivamente envolvida com progressão, invasão, migração e adesão tumoral, assim como se mostrou estar envolvida em crescimento celular tumoral, maturação, diferenciação, invasividade, metástases, evasão imune e resistência a drogas (PATRITTI *et al.*, 2021; JUBBER *et al.*, 2023)

Por sua vez, a ectoenzima ADA tem como função promover a desaminação hidrolítica, na superfície celular, da Ado em inosina (ROBSON *et al.*, 2006; YEGUTKIN, 2008). A sua deficiência contribui para o desenvolvimento de patologias, devido o aumento anormal das concentrações de Ado extracelular (MARTINS *et al.*, 2016).

Assim, a ADA desempenha um papel importante na regulação imune, especialmente na proliferação, maturação e diferenciação de linfócitos. Seu papel tem sido estudado nos processos inflamatórios e nas doenças malignas (CHEN *et al.*, 2015), uma vez que alterações na atividade da ADA já foram detectadas em pacientes com vários tipos de câncer (ZHULAI *et al.*, 2022). Desse modo, a baixa atividade da ADA pode ser responsável pela diminuição da função imunológica celular em pacientes com câncer (CAMICI *et al.*, 2019). Contrariamente, alguns estudos que mostram a alta atividade da ADA como vantajosa para as células cancerígenas, podendo ser um mecanismo compensatório contra o acúmulo tóxico de seus substratos (CAMICI *et al.*, 2019).

Frente ao exposto, é inegável que a sinalização purinérgica pode regular inúmeras funções celulares. Contudo, é fundamental salientar a capacidade que esse sistema tem de



modular respostas inflamatórias e imunológicas nos processos patológicos, especialmente nas doenças oncológicas. Visto isso, a ativação da cascata de citocinas inflamatórias está intimamente relacionada com as respostas do sistema purinérgico (MAYNARD; SFANOS, 2022). As citocinas, que medeiam as respostas de defesa do organismo, são produzidas por células do sistema imune e influenciam, inclusive, a proliferação, diferenciação, migração e morte celular (SAMADI *et al.*, 2023).

Dessa forma, o microambiente tumoral é altamente orquestrado para favorecer o desenvolvimento de células malignas. Nesse contexto, ocorre a inibição da resposta imune antitumoral e o estímulo à angiogênese e à invasão tecidual por células neoplásicas. Todavia, como mecanismo compensatório, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias são liberados pelas células vizinhas ao tumor, estimulando a proteção dos tecidos adjacentes. No CaB, destacam-se o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas IL-2 e IL-6, que atuam como moléculas pró-inflamatórias. Em resposta a isso, são liberadas IL-4 e IL-10, capazes de destruir patógenos e organizar respostas imunes antitumorais (FIGUEIREDO, 2019; MAYNARD; SFANOS, 2022).

No contexto da inflamação crônica no CaB, a IL-6 é uma das responsáveis pela liberação de IL-2, induzindo o recrutamento das células imunes inatas para a ativação da cascata inflamatória contra as células tumorais. Isso amplifica a inflamação local e envia sinais de alarme para outras células do sistema imune (QUADROS *et al.*, 2021). Baixos níveis de IL-6 provocam o enfraquecimento das respostas imunológicas (SEIF *et al.*, 2023). Em contrapartida, a IL-6 destaca-se principalmente em fases agudas da doença, agindo mediante a presença de DAMPs e estimulando a resposta imunológica contra as células cancerígenas (FIGUEIREDO, 2019; PELUZZO *et al.*, 2022). Além disso, os macrófagos M2 são responsáveis pela liberação de IL-4 e IL-10, que estão envolvidas na angiogênese, pois são indispensáveis para o crescimento do endotélio vascular, e na metastatização de tumores, uma vez que favorecem a infiltração das células neoplásicas (DING *et al.*, 2023).

Diante disso, entendemos que a exploração das vias comuns que associam a desregulação da sinalização purinérgica e os processos inflamatórios no cenário das doenças urológicas pode, em última análise, auxiliar na obtenção de novas percepções mecanicistas dos processos da doença e no direcionamento terapêutico no CaB.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho está vinculado ao Projeto “Guarda-Chuva” intitulado: “Biorrepositório de biópsias tumorais para avaliação da expressão gênica e proteica dos receptores e enzimas do sistema purinérgico em ênfase em tumores de mama, próstata e colorretal”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da UFFS sob o protocolo número 87508918.4.0000.5564. O presente estudo é caracterizado como quantitativo observacional transversal. O material biológico foi coletado no período de agosto de 2022 a dezembro de 2023, no qual se procedeu a avaliação da atividade das enzimas purinérgicas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase (em plaquetas) e ADA (em soro), além da dosagem dos níveis plasmáticos de IL-4, IL-6 e IL-10 de 29 pacientes com CaB em estadiamentos iniciais, recém diagnosticados com a doença, anteriormente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico. O grupo controle foi composto por 36 indivíduos, com idade semelhante à do grupo investigado. Os pacientes foram selecionados por meio de contato prévio dos pesquisadores com o serviço de Urologia e Quimioterapia do Hospital Regional do Oeste (HRO), localizado em Chapecó/SC, momento no qual foram convidados pelos pesquisadores a participar do estudo, recebendo informações acerca dos objetivos do mesmo e das intervenções que seriam realizadas. Os voluntários foram, então, convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme ANEXO I. O sangue venoso coletado foi utilizado para obtenção das plaquetas e separação de soro e plasma. As análises bioquímicas e moleculares foram realizadas nos laboratórios de pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - Campus Chapecó (SC). As informações de prontuário médico foram obtidas nas pastas dos pacientes arquivadas no HRO, e foram utilizadas para complementar as análises biológicas.

### 4.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES

A seleção da amostra foi realizada por conveniência e os critérios de inclusão consistiram em pacientes voluntários com idade igual ou superior a dezoito (18) anos completos, diagnosticados por médico urologista ou oncologista conforme CID C67, que ainda não tivessem realizado a remoção cirúrgica do tumor ou iniciado o tratamento farmacológico antineoplásico. Os indivíduos controle selecionados foram voluntários com idade igual ou superior a dezoito (18) anos completos e sem diagnóstico de CaB.

#### 4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes voluntários com idade entre dezoito (18) anos completos e setenta (70) anos com diagnóstico de CaB realizado por médico oncologista ou urologista conforme CID 10;
- Não ter realizado a remoção cirúrgica do tumor ou iniciado o tratamento com os antineoplásicos no momento da participação no estudo;

#### 4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes que apresentarem qualquer outro diagnóstico de câncer;

#### 4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

##### **4.5.1 Coleta e processamento das amostras biológicas**

Foi realizada coleta de sangue, por punção venosa, de vinte e nove (n= 29) pacientes com diagnóstico de CaB, e trinta e seis (n= 36) indivíduos controle, seguindo os critérios de inclusão e exclusão. O volume de sangue puncionado foi de 30mL, sendo coletado em tubos *vacutainer* contendo citrato como anticoagulante para a obtenção das plaquetas, EDTA como anticoagulante para a separação do plasma e tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro. Os indivíduos controle foram selecionados em outros ambientes de saúde no município de Chapecó/SC, com base em pareamento por idade ( $\pm$  5 anos) e gênero em relação aos pacientes. O procedimento para coleta de sangue foi o mesmo realizado nos pacientes e somente foi conduzido após assinatura do TCLE. As análises bioquímicas foram realizadas nos laboratórios de pesquisa biológica da UFFS - Campus Chapecó/SC, onde as amostras de plaquetas, soro e plasma foram armazenadas em microtubos tipo eppendorf, identificados e congelados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

##### **4.5.2 Dosagem de proteínas**

A quantificação dos níveis protéicos em plaquetas de indivíduos controles e de pacientes foi realizada pelo método de Comassie Blue segundo Bradford (Bradford, 1976), utilizando como padrão a albumina bovina.

#### 4.5.3 Determinação da atividade da E-NTPDase e da E-5'-nucleotidase

A atividade das enzimas CD39 e CD73 foi determinada em plaquetas segundo Pilla *et al.* (1996) modificado por Lunkes *et al.* (2003). A determinação da atividade das enzimas E-NTPDase e E-5'-nucleotidase foi pela medida da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado usando-se um ensaio colorimétrico. 20 uL de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) foram adicionados a 160 uL do sistema de incubação da E-NTPDase e pré incubados por 10 minutos a 37 °C. Para a atividade da E-NTPDase em plaquetas, o sistema de incubação contém NaCl 1200 mM, Glicose 60 mM, KCl 50 mM, tampão de Tris HCl 500 mM pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 50 mM e H<sub>2</sub>O *Milli Q*. Para a atividade da E-NTPDase em plaquetas, a concentração de glicose utilizada no sistema de incubação é de 60 mM. Para a atividade da E-5'-nucleotidase em plaquetas substitui-se o CaCl<sub>2</sub> por MgCl<sub>2</sub> 100 mM. A reação foi iniciada pela adição de 20 uL de ATP ou ADP como substrato a uma concentração final de 20 uL de AMP na concentração de 20 mM. As reações da E-NTPDase e E-5'-nucleotidase foram paradas pela adição de 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) 15%. O Pi liberado pela hidrólise de ATP, ADP e AMP foi medido pelo método de CHAN *et al.*, 1986. A leitura foi feita em espectrofotômetro em  $\lambda$  630 nm. Amostras de pacientes e controles e analisadas em triplicatas. O controle da hidrólise não enzimática foi realizado conforme descrito para as amostras, porém sem adição de enzima. A atividade enzimática expressa em nmol Pi liberado/min/mg proteína.

#### 4.5.4 Determinação da atividade da ADA

A atividade da ADA em soro foi determinada de acordo com o protocolo de Giusti e Galanti (1974). A reação colorida, que revela a quantidade de amônia liberada pela ação da enzima, foi realizada segundo a reação de Chaney e Marbach (1962) que produz uma cor azul. Esta técnica baseia-se na dosagem da amônia liberada pela transformação da adenosina em inosina, catalisada pela ADA. A amônia forma, na presença de fenol, em solução alcalina, um derivado indofenol que apresenta coloração azul e pode ser lido em espectrofotômetro  $\lambda$  620 nm. A atividade enzimática foi expressa em U/L.

#### 4.5.5 Quantificação de Interleucinas plasmáticas

Para determinação dos parâmetros inflamatórios, os níveis de Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-4 (IL-4) foram analisados em amostras de plasma utilizando o kit comercial CBA (*Cytometric Brad Array*) Kit II para citocinas humanas de perfil Th1/Th2 da *BD Biosciences*<sup>TM</sup> (San Diego, CA, EUA – Catálogo: 551809). O procedimento

experimental consiste na preparação de um mix de citocinas utilizando seis populações de *beads* com distinta intensidade de fluorescência, seguido da adição da amostra e da conjugação com anticorpo de captura específico. Após período de incubação, as amostras foram capturadas em citômetro de fluxo *BD Accuri™ C6 Plus* (San Diego, CA, EUA) e os resultados obtidos foram analisados pelo *CBA Analysis Software (BD Biosciences™)* pelo cálculo da equação da reta utilizando os valores obtidos na curva padrão.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism 8.0.1* (GraphPad Software, San Diego, California, USA). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, os quais apresentaram distribuição normal. Os *outliers*, foram analisados pelo próprio *software* e removidos apenas para a análise das variáveis que se diferenciavam dos demais dados. Sobre as variáveis do estudo, as diferenças entre pacientes com CaB e indivíduos controle foram avaliadas pelo teste *t de Student* e teste de *Mann-Whitney* para dados não paramétricos. As diferenças entre os subgrupos para as atividades enzimáticas foram avaliadas por meio da análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Pela análise da Tabela 1 podemos observar dados relacionados às características gerais da população amostral tal como idade, gênero, consumo de tabaco e história de CaB em familiares com 1º grau de parentesco, e o estadiamento clínico dos pacientes com CaB.

Neste estudo, dos 29 pacientes com CaB que foram analisados, 68,9% (n=20) eram do sexo masculino e 31,1% (n=9) eram do sexo feminino. A média de idade dos pacientes foi de 69 anos ( $69 \pm 9,21$ ). No grupo controle, dos 36 indivíduos participantes 75% (n=27) eram do sexo masculino e 25% (n=9) eram do sexo feminino, com idade média de 70 anos ( $70 \pm 8,41$ ).

Como é possível observar, 65,5% dos pacientes são tabagistas (n=19) e apenas 3,45% (n=1) dos pacientes apresentaram histórico de CaB em familiares de 1º grau de parentesco.

Sobre o estadiamento clínico dos pacientes envolvidos no estudo, pela análise dos prontuários médicos, observa-se que a maioria dos pacientes com CaB (62,06%; n=18) foi classificada no Estádio 0 da doença - condição associada à grande probabilidade de cura com a aplicação de protocolos cirúrgicos menos invasivos, uma vez que o tumor encontra-se limitado à camada interna da bexiga (epitélio transicional). Ainda, 37% (n=11) dos pacientes foram classificados no Estádio I da doença - condição associada à presença de células tumorais na camada de tecido conjuntivo da bexiga, mas sem invasão da musculatura, ainda. Vale destacar, nesse ponto, que outros estadiamentos clínicos não foram contemplados no estudo porque a população não apresentava classificação em estadiamentos mais avançados.

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes e controles e estadiamento em pacientes

<b>Características</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Controles</b>
<b>Número amostral</b>	29	36
<b>Idade</b>		
Média ± Desvio Padrão	69 ± 9,2101	70 ± 8,4136
<b>Gênero</b>		
Masculino	20 (68,97%)	27 (75%)
Feminino	9 (31,03%)	9 (25%)
<b>Tabagismo</b>		
Sim	19 (65,52%)	2 (5,56%)
Não	10 (34,48%)	34 (94,44%)
<b>Tabagismo</b>	n = 19	n = 2
Homens	12 (63,16%)	2 (100%)
Mulheres	7 (36,84%)	0
<b>Histórico de CaB em 1º grau parentesco</b>		
Sim	1 (3,45%)	0
Não	28 (96,55%)	36 (100%)
<b>Estadiamento</b>		
0	18 (62,06%)	-
I	11 (37,94%)	-

Fonte: Elaborada pelos autores (2024).

## 5.2 ATIVIDADE DA E-NTPDASE, E-5'-NUCLEOTIDASE E ADA

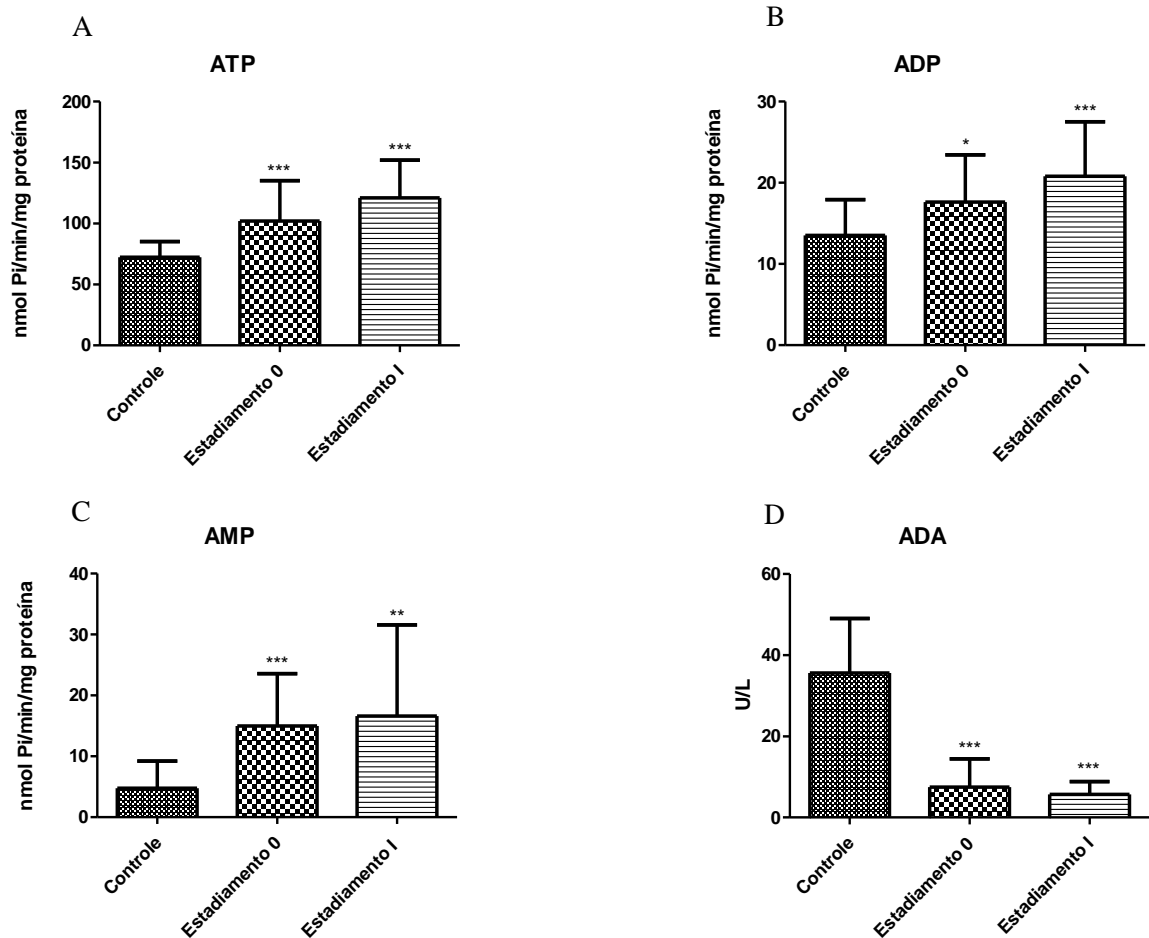
Podemos observar, pela análise da Figura 3, as atividades das enzimas E-NTPDase e E-5'-nucleotidase, em plaquetas, e ADA, em soro, de pacientes em diferentes estadiamentos do CaB. A Figura 3A representa a atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ATP. Podemos observar que a hidrólise de ATP foi significativamente maior no grupo de pacientes com CaB

nos Estadiamento 0 e I do que no grupo de indivíduos controle [ $102.1 \pm 8.257$ ;  $121 \pm 7.085$  vs.  $72.30 \pm 2.741$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0, I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ). A Figura 3B representa a atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ADP. Observou-se um aumento estatístico tanto em pacientes com CaB em Estadiamento 0, quanto em pacientes com CaB no Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle [ $17.64 \pm 1.330$ ;  $20.82 \pm 1.619$  vs.  $13.50 \pm 0.9480$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0, I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,0005$ ).

A Figura 3B representa a atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ADP. Observou-se um aumento estatístico tanto em pacientes com CaB em Estadiamento 0, quanto em pacientes com CaB no Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle [ $17.64 \pm 1.330$ ;  $20.82 \pm 1.619$  vs.  $13.50 \pm 0.9480$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0, I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,0005$ ).

A Figura 3C representa a atividade da E-5'-nucleotidase para a hidrólise do AMP. Observou-se um aumento estatístico tanto em pacientes com CaB em Estadiamento 0, quanto em pacientes com CaB no Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle [ $14.97 \pm 2.227$ ;  $16.61 \pm 3.432$  vs.  $4.751 \pm 0.9959$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0, I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ) e ( $p < 0,005$ ).

Pela análise da Figura 3D podemos observar a atividade da ADA, em soro, de pacientes em diferentes estadiamentos do CaB. Observou-se uma diminuição na atividade tanto em pacientes com CaB em Estadiamento 0, quanto em pacientes com CaB no Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle [ $7.466 \pm 1.462$ ;  $5.729 \pm 0.6882$  vs.  $35.64 \pm 2.402$  U/L, em pacientes no Estadiamento 0, I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ).

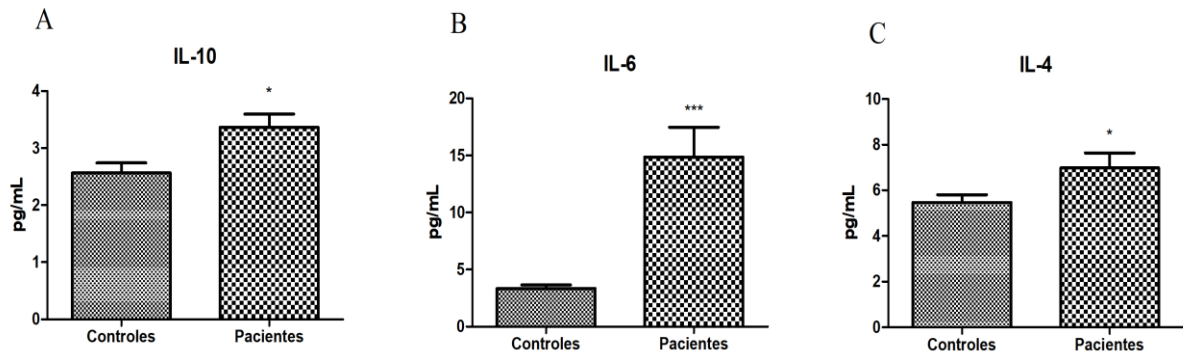


**Figura 3** - Atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e ADA em pacientes com CaB com estadiamento clínico 0 e I. A) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP. B) Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP. C) Atividade da E-5'-nucleotidase para a hidrólise do AMP. D) Atividade da ADA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, (n= 36) para controles, (n= 18) para Estadiamento 0, (n= 11) para Estadiamento I. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.005$ ; \*\*\* $p \leq 0.0005$ .

### 5.3 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-10, IL-6 E IL-4

Na Figura 4 é possível observar os níveis plasmáticos das IL. Observou-se um aumento significativo dos níveis de IL-10, IL-6 e IL-4 nos pacientes com CaB em relação ao grupo controle. A) IL-10: [ $3.364 \pm 0.2321$  vs.  $2.564 \pm 0.1750$  pg/mL, em pacientes e no grupo controle, respectivamente]. B) IL-6: [ $14.85 \pm 2.611$  vs.  $3.350 \pm 0.3011$  pg/mL, em pacientes e no grupo controle, respectivamente]. C) IL-4: [ $6.979 \pm 0.7140$  pg/mL vs.  $5.470 \pm 0.3350$  pg/mL, em pacientes e no grupo controle, respectivamente].





**Figura 4** - Níveis plasmáticos de IL em pacientes com CaB. A) Níveis de IL-10. B) Níveis de IL-6. C) Níveis de IL-4. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, (n= 36) para controles, (n= 29) pacientes \* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.0005$ .

## 6 DISCUSSÃO

Segundo o relatório publicado na *World Cancer Report*, no ano de 2023, pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), o CaB está entre os tumores mais incidentes e letais, especialmente na população masculina mundial. O maior acometimento dos homens pelo CaB ficou evidente em nosso estudo, já que aproximadamente 70% da população incluída na pesquisa foi do gênero masculino. Uma possível explicação para essa ocorrência está na relação direta entre o desenvolvimento do CaB e o tabagismo, que está destacado como um dos principais agentes carcinogênicos ambientais e promotores do CaB (JUBBER *et al.*, 2023). A extensa maioria dos pacientes aqui estudados eram tabagistas, com média de idade de 69 anos.

Outros estudos têm revelado achados semelhantes, como é o caso do trabalho desenvolvido por Da Paz *et al.* (2022) no qual analisou que cerca de 90% dos pacientes com CaB fumantes têm mais de 55 anos, com uma idade média de diagnóstico de 73 anos. Nesse contexto, segundo o INCA (2022), há uma estimativa de quase 10 mil novos casos da doença a cada ano, com uma incidência significativamente maior em homens, que são três a quatro vezes mais propensos a desenvolver a doença entre os 60 e 70 anos de idade. Além disso, dados de Jubber *et al.* (2023) também confirmam nossos achados, mostrando em um estudo de coorte, com mais de 30 anos (422.010 participantes), que os homens fumantes têm um risco duas a três vezes maior de desenvolver câncer de bexiga em comparação com as mulheres fumantes. Tudo isso corrobora com a análise conjunta de sete coortes australianas (364.426 pacientes), no qual avaliou o risco de CaB devido ao tabagismo foi estimado em 44% no geral, sendo 53% em

homens e 19% em mulheres (CONTE, 2021; JUBBER *et al.*, 2023).

No que diz respeito à atividade da E-NTPDase e da E-5'-nucleotidase em plaquetas, nossos resultados demonstraram um aumento na atividade dessas enzimas em pacientes com CaB em estadiamentos não invasivos. É extensamente referido na literatura que os nucleotídeos, especialmente o ATP, atuam como moléculas sinalizadoras endógenas de injúrias, desencadeando uma resposta do sistema imune (ZHANG, MOSSER, 2008). Os nucleotídeos ATP e ADP são exocitados pelas células, constantemente, em baixas concentrações, entretanto, quando há lesão celular essas moléculas são liberados em altas concentrações e ativam receptores purinérgicos específicos da superfície da membrana como o P2X7 e P2Y1. Nas doenças tumorais em estágio superficial, o ATP é a principal molécula sinalizadora de dano celular, desenvolvendo efeitos pró-inflamatórios através da liberação de citocinas como a IL2 e o IFN-gama, estimulando, também, a proliferação de linfócitos (FERLEY *et al.*, 2020; MORELLO *et al.*, 2021).

No processo de desenvolvimento e progressão tumoral do CaB, há notavelmente um favorecimento da injúria e lesão de células, colaborando para a liberação de grandes quantidades de ATP para o meio extracelular - que propiciarão o desenvolvimento de um microambiente pró-inflamatório, que é amplificado a medida que a progressão tumoral se estabelece, tendo em vista que a atividade da E-NTPDase aumentou de modo contundente em pacientes com Estadiamento 0 e I do CaB, em comparação com os controles. É evidente, também, que a maior disponibilidade de ATP extracelular favorece a atividade máxima da E-NTPDase, haja vista a presença de substrato em elevadas concentrações. Resultados similares aos nossos foram observados em estudos realizados em pacientes com Linfoma de Hodgkin e em pacientes com Mieloma Múltiplo, onde os nucleotídeos dominaram, sendo posteriormente hidrolisados em AMP e ADP, respectivamente, (HESSE *et al.*, 2024), reforçando a relação entre o desenvolvimento de doenças neoplásicas e as alterações nas atividades das enzimas do sistema purinérgico.

Investigações adicionais têm revelado, nesse contexto, que a superexpressão da E-NTPDase em células malignas está associada com uma imunidade antitumoral prejudicada (MICHAUD *et al.*, 2011; PIETROCOLA *et al.*, 2016), bem como a superexpressão da E-5'-nucleotidase foi relacionada com o aumento da capacidade de invasão e potencial metastático das células tumorais (ZHOU *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2017). Não bastasse, diversos estudos apontam para a relação entre aumento da expressão de enzimas geradoras de adenosina ou receptores de adenosina à progressão do câncer. Assim, a maior expressão da E-NTPDase foi associada a um grau avançado no estadiamento TNM de tumores ou ao pior prognóstico em

vários tipos de neoplasias (PULTE *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2020; ALIAGAS *et al.*, 2014; KÜNZLI *et al.*, 2007; LIE *et al.*, 2017). Nosso trabalho também revelou que a atividade da E-NTPDase em plaquetas, para a hidrólise do ADP, aumentou bruscamente nos pacientes com CaB nos estadiamentos 0 e I. O ADP também apresenta funções sinalizadoras endógenas na vigência de danos celulares, induzindo a agregação plaquetária. Os participantes do nosso estudo, possivelmente, não estão expostos a um risco trombótico, uma vez que esse nucleotídeo está sendo amplamente hidrolisado a AMP. Morello *et al.*, (2021) afirmam que altas concentrações de ADP são encontradas especialmente em estágios tumorais mais avançados, geralmente em fases metastáticas, e agem estimulando a formação de trombos.

Tomados esses resultados em conjunto, podemos inferir que há geração de quantidades expressivas de Ado nos pacientes com CaB estudados. Alguns trabalhos mostram que as células cancerígenas criam um microambiente favorável a sua manutenção às custas da: a) liberação aumentada de ATP por células tumorais, células apoptóticas e linfócitos infiltrantes no tumor (DI VIRGILIO *et al.*, 2018) e; b) manutenção permanente de altos níveis de Ado no tumor hipóxico (VAUPEL, P.; MULTHOFF, G., 2017).

Os níveis de Ado são regulados pela atividade da adenosina quinase (ADK) e da ADA, nesta última atuando de modo mais evidente quando os níveis de Ado forem supra-fisiológicos, através da geração de (BAGHERI *et al.*, 2019; SPYCHALA, J, 2000). A ADA possui duas isoformas, ADA1 e ADA2. A ADA1 é altamente expressa pelas células T e B, sendo responsável por aproximadamente 90% de toda a atividade da ADA (KALJAS *et al.*, 2017). Alguns autores relatam uma associação entre a alta atividade de ADA e o estágio da doença para diversos cânceres, incluindo CaB (PIRINÇÇI *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos observaram que, para alguns tipos de câncer, a diminuição na atividade da ADA estaria associada à progressão de doenças como câncer de cabeça e pescoço, próstata e laringe (BATTISTI *et al.*, 2013). Sugere-se que, por serem processos inter-relacionados e coincidentes, tanto a hipóxia quanto a inflamação, presentes no processo de desenvolvimento tumoral, elevem os níveis de Ado no interior do tumor (LOSENKIVA *et al.*, 2020). Este mecanismo atua na modulação das respostas inflamatórias excessivas, por meio da ativação de receptores anti-inflamatórios expressos em linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos e outros linfócitos infiltrantes de tumor (BOWSER *et al.*, 2017).

Nosso estudo demonstrou que a atividade da ADA no soro está diminuída no subtipo não invasivo do CaB, favorecendo o acúmulo desse nucleosídeo no organismo dos pacientes. Essa menor atividade poderia estar facilitando a progressão tumoral, colaborando a invasão de tecidos adjacentes e um pior prognóstico, haja vista a potente ação imunossupressora da Ado.

Ainda, o acúmulo de Ado, provavelmente devido ao esgotamento da atividade de ADA em tumores de estágios mais avançados, resulta em linfotoxicidade, promovendo imunodeficiência combinada grave (ZANINI *et al.*, 2019). Diferentemente, autores identificaram que os níveis de ADA em pacientes com CaB estavam elevados no carcinoma de células transicionais, correlacionando-se com o estágio da doença, atividade, curso clínico e a ressecção do tumor (SUFRIN *et al.*, 1978). Adicionalmente, no mesmo trabalho foi sugerido que a alta atividade de ADA pode servir como indicador sensível para o CaB (SUFRIN *et al.*, 1978; PIRINÇÇI *et al.*, 2012).

Em relação às interleucinas, nossos pacientes apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de IL-4. Corroborando com nossas investigações, pesquisas têm demonstrado que o aumento dos níveis de IL-4 está intimamente associado ao processo tumorigênico e à formação de metástase, determinando que sua presença em grandes concentrações pode favorecer a sobrevivência das células tumorais, por mediar a resistência à apoptose e fortalecer o metabolismo (VENMAR *et al.*, 2015). Além disso, outros estudos demonstraram que a presença excessiva de IL-4 nas células T está relacionada com um pior prognóstico e com a progressão da doença (KWASNIAK *et al.*, 2019). Nesse sentido, autores descrevem que a interação de IL-4 com outras interleucinas, como a IL-17, podem gerar efeitos sinérgicos para a tumorigênese, ou modificar o fenótipo dos macrófagos promotores do câncer, em ação conjunta com a IL-6 (GUO *et al.*, 2019). De outro modo, alguns pesquisadores apontam para a IL-4 como uma interleucina dual, por seus efeitos diferenciais positivos e negativos nos tumores, a depender da entrega exógena ou endógena desse marcador inflamatório (LI, Z; CHEN, L; QIN, Z., 2009). Vale a ressalva de que estudos apontaram que a IL-4 exógena foi capaz de inibir, apenas modestamente, o crescimento de CaB *in vitro* (LI *et al.*, 2008).

A respeito do tabagismo, principal fator de risco para o CaB, trabalhos provaram que fumar estimula a produção de EROs, induz danos ao DNA, além de inibir a função das células dendríticas e a secreção de IFN- $\gamma$ , contudo, aumenta a produção de IL-4 (VASSALLO *et al.*, 2005), corroborando para o fato de que a alta concentração dessa interleucina desempenha papel significativo no aumento do risco de CaB. No estado homeostático normal, os níveis de IL-6 são tipicamente muito baixos (PETER *et al.*, 2001). Em abundância, têm a capacidade de amplificar a inflamação crônica prócarcinogênica, através da indução da sinalização de fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K)-AKT/mTOR, a qual ativa o Fator 1 $\alpha$  induzível por hipóxia (HIF1 $\alpha$ ) e diminui a fosforilação oxidativa, exacerbando a carcinogênese induzida por inflamação (WHITLEY *et al.*, 2018). Ainda assim, é importante ressaltar que a IL-6 contribui para angiogênese e para a vascularização tumoral por intermédio do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

(KUMARI *et al.*, 2016), limitando também a capacidade do TGF- $\beta$  de promover o desenvolvimento de células Treg e, conseqüentemente, ampliando a resposta pró-inflamatória por meio da diferenciação de células Th17 (KNOCHELMANN *et al.*, 2020).

Além disso, as células Th17 diferenciadas são uma fonte importante de IL-10, a qual, em condições crônicas, suprime respostas antitumorais (SAWANT *et al.*, 2019). A IL-10 é uma citocina imunossupressora que promove o escape imunológico do tumor, diminuindo a resposta imune antitumoral no microambiente tumoral (FRANCO *et al.*, 2015). Nessa justificativa, diversos estudos demonstram uma correlação positiva entre níveis de IL-10, seja no soro ou dentro do tumor, e mau prognóstico para o paciente (KUMARI *et al.*, 2017). Nosso estudo demonstrou aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 nos pacientes com CaB, podendo ser um fator que, em longo prazo, favoreça a progressão do tumor. Outrossim, relaciona-se a secreção de IL-10 às próprias células tumorais, sugerindo sinalização autócrina. Essa correlação permite observar uma relação causal entre IL-10 e crescimento tumoral (FRANCO *et al.*, 2015), no entanto, sabe-se que há atuação concomitante de outras citocinas no microambiente tumoral que afetam a expressão de IL-10.

Por outro lado, estudos demonstram que a IL-10 pode ter efeitos antitumorais potencialmente eficazes em determinadas condições. Linhagens de modelos animais desenvolvidas para expressar IL-10 mostraram rejeição rápida do tumor, a qual aumentou após a secreção de IL-10 (GIOVARELLI *et al.*, 1995). Esta descoberta é validada por outros autores onde tumores estabelecidos apresentaram taxas de crescimento reduzidas após injeção de IL10, bem como inibição das metástases de maneira imunodependente (GONZALEZ, E.; ARMS, L.; VIZZARD, M., 2014). Para esse fato, um possível mecanismo proposto é a estimulação de células NK mediada por IL-10, com aumento de TIA-1 (proteína que favorece citotoxicidade) em resposta à IL-10 (MOCELLIN *et al.*, 2004). Ainda, sabe-se que a expressão diminuída de moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em células apresentadoras de antígenos (APC) é resultado da atividade de IL-10, o que gerou aumento da rejeição/destruição do tumor mediada por células *Natural Killer* (NK) e/ou inibição de metástases (DONG *et al.*, 2024). Notavelmente demonstra-se a necessidade de expansão dos estudos a fim de verificar a ambigüidade funcional da IL-10 em diferentes ambientes e concentrações.

Ante o exposto, a análise desses resultados, em conjunto, apresenta grande relevância para o contexto médico e de saúde pública, visto que medidas preventivas e paliativas podem ser adotadas de maneiras mais eficientes, a fim de que os pacientes com diagnóstico de CaB possam apresentar uma melhor qualidade de vida e um prolongamento da sobrevivida.

## 7 CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi possível relacionar a atividade da E-NTPDase, da E-5'-nucleotidase e da ADA com diferentes estadiamentos tumorais no CaB. Notavelmente, essa patologia altera significativamente a atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas e soro, muito provavelmente porque o processo carcinogênico envolve eventos relacionados à lesão celular e apoptose, condições associadas à liberação de grandes quantidades de ATP para o meio extracelular. A maior disponibilidade de substrato da E-NTPDase, promove aumento da atividade dessa enzima e, conseqüentemente, aumento da atividade de toda a cascata enzimática responsável pela metabolização dos produtos subsequentes. A menor atividade da ADA favorece o acúmulo de Ado, facilitando as ações imunossupressoras dessa molécula e comprometendo a vigilância imune frente ao desenvolvimento tumoral. Em tempo, experimentos adicionais sobre a expressão de receptores e análises no tecido tumoral são necessários para corroborar com os resultados encontrados aqui, a fim de que a modulação da sinalização purinérgica possa integrar a base de novos fármacos e protocolos terapêuticos eficientes o controle do desenvolvimento e da progressão do CaB.

## REFERÊNCIAS

- ADINOLFI, V. Bladder Cancer: Current Understanding and Future Directions. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 143, n. 4, p. 701-710, 2017.
- ALIAGAS, E. M. et al. The role of purinergic signaling and interleukins in bladder cancer: an integrated review. **Journal of Urology Research**, v. 40, n. 1, p. 45-53, 2014.
- AMIN, M. B. et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 93-99, 2017. DOI: 10.3322/caac.21388.
- BAGHERI, S et al. Thomas. Adenosine deaminase inhibition. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 141, p. 1246-1257, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.078.
- BATTISTI, V et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, 2013. DOI: 10.1016/j.biopha.2012.12.004.
- BOISON, J. C. Advances in Bladder Cancer Research: Current Progress and Future Directions. **Bladder Cancer Journal**, v. 8, n. 3, p. 243-258, 2022.
- BOWSER, Jessica; LEE, Jae; YUAN, Xiaoyi et al. The hypoxia-adenosine link during inflammation. **Journal of Applied Physiology**, v. 123, n. 5, p. 1303–1320, 2017. DOI: 10.1152/japplfisiol.00101.2017.
- BULANOVA, Elena et al. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. **Journal immunology**, v. 174, n. 7, p. 3880-3890, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.174.7.3880.
- BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 166-176, 2006.
- BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 22, p. 364-373, 2002. DOI: 10.1161/hq0302.105360.
- CAMICI, Marcella et al. Purine-Metabolising Enzymes and Apoptosis in Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 9, sep. 2019. DOI: 10.3390/cancers11091354.
- CARDOSO, F J B et al. Identification of potential inhibitors of *Schistosoma mansoni* purine nucleoside phosphorylase from neolignan compounds using molecular modelling approaches. **Journal of Biomolecular Structure Dynamics**. v.40 ed.18. p. 8248-8260, 2022 doi: 10.1080/07391102.2021.1910073.
- CHEN, Wangxue et al. Elevated serum adenosine deaminase levels in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, n. 4, p. 540-550, aug. 2015. DOI: 10.1111/ijlh.12334.

CONTE, A. Advances in the Treatment of Bladder Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n. 4, p. 365-372, 2022

CONTE, D. Prevalent risks for bladder cancer: a literature review. **Faculdade da Serra Gaúcha (FSG) - Centro Universitário**. Caxias do Sul-RS, Brasil. RBAC. v.53 ed.1, p. 28-31, 2021.

COUTINHO, A. Bladder Cancer: Diagnostic and Therapeutic Advances. **Revista Brasileira de Oncologia**, v. 16, n. 1, p. 45-58, 2020.

DIETRICH, F. Envolvimento Da Sinalização Purinérgica Em Estratégias Terapêuticas Para o Tratamento Da Cistite Hemorrágica e Do Câncer De Bexiga. **Dissertação (Doutorado em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2016.

DING, Y et al. M2 Macrophage-Derived Extracellular Vesicles Containing MicroRNA-501-3p Promote Colon Cancer Progression Through the SETD7/DNMT1/SOCS3 Axis. **Diseases Colon Rectum**. v.66, ed.12 p. e1234-e1245, 2023. doi: 10.1097/DCR.0000000000002986. Epub 2023 Sep 11. PMID: 37695661.

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 18, n. 7, p. 601-618, 2018. DOI: 10.1038/s41568-018-0037-0

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, p. 1-11, 2017.

DI VIRGILIO, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 2012.

DI VIRGILIO, F. et al. Purinergic P2X7 receptor: apivotal role in inflammation and immunomodulation. **Drug Development Research**, v. 45, p. 207-213, 1998. DOI: 10.1186/1476-9255-4-5.

DONG, C. et al. CircRNA LOC729852 promotes bladder cancer progression by regulating macrophage polarization and recruitment via the miR-769-5p/IL-10 axis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 28, n. 7, 2024. DOI: 10.1111/jcmm.18225.

FERLEY, J L et al. Global cancer observatory: cancer tomorrow. Lyon, **France: International Agency for Research on Cancer**; 2020.

FIGUEIREDO. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.3 p.55, 2019. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190029>

FRANCO, R. A. Bladder Cancer: Pathophysiology and Treatment Options. **Cancer Treatment Reviews**, v. 55, p. 15-23, 2017.

FRANCO, R. A. et al. The role of interleukins and purinergic signaling in bladder cancer:



mechanisms and potential targets. **Cancer Research and Treatment**, v. 47, n. 2, p. 233-242, 2015.

GAO, X. et al. Purinergic signaling in bladder cancer: potential targets and therapeutic strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 527, 2017.

GONZALEZ, E et al. The role(s) of cytokines/chemokines in urinary bladder inflammation and dysfunction. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/120525.

GIOVARELLI, M et al. Local release of IL-10 by transfected mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances antitumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. **Journal of Immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 155, n. 6, p. 3112–3123, 1995.

GLOBOCAN. Estatísticas globais de câncer de 2022: estimativas GLOBOCAN de incidência e mortalidade mundial **Cancer Today**, 2022. Disponível em: < <https://gco.iarc.who.int> > Acesso em: 29 jul. 2024.

GUO, M. et al. Triggering MSR1 promotes JNK-mediated inflammation in IL-4-activated macrophages. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 11, 2019. DOI: 10.15252/emj.2018100299.

HALLIWELL, B. et al. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HESSE, J. et al. Crosstalk intercelular molda o metabolismo purinérgico e a sinalização nas células cancerígenas. **Relatórios de Células**, v. 1, 2024. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113643.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer de bexiga**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>. Acesso em: 3 ago. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer de bexiga**. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>. Acesso em: 29 jul. 2024.

JUBBER, S et al. Epidemiology of Bladder Cancer in 2023: A Systematic Review of Risk Factors, **European Urology**, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2023.03.029>

KALJAS, Y. et al. Human Adenosine Deaminases ADA1 e ADA2 ligam-se a diferentes subconjuntos de células imunológicas. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, p. 555-570, 2017. DOI: 10.1007/s00018-016-2357-0.

KEPP, O et al. Takahiro; et al. ATP and cancer immunosurveillance. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 13, 2021. DOI: 10.15252/emj.2021108130.

KNOCHELMANN, H.M. et al. IL6 Fuels Durable Memory for Th17 Cell-Mediated Responses to Tumors. **Cancer Research**, v. 80, n. 18, p. 3920–3932, 2020. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3685.

KUMARI, N. et al. Ashwani Kumar; et al. Predictive role of serum and urinary cytokines in invasion and recurrence of bladder cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, v. 39, n. 4, 2017. DOI: 1010428317697552.

KUMARI, N. et al. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, v. 37, n. 9, p. 11553–11572, 2016. DOI: 10.1007/s13277-016-5098-7.

KUNZLI, B. et al. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. *Purinergic Signalling*, v. 7, n. 2, p. 231-241, jun. 2011. DOI: 10.1007/s11302-011-9228-9.

KUNZLI, A. et al. The role of purinergic signaling in bladder cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. *European Urology*, v. 52, n. 4, p. 951-959, 2007.

KWASNIAK, M. et al. Interleukins and purinergic signaling in bladder cancer: mechanisms, interactions, and clinical implications. *Oncotarget*, v. 10, n. 36, p. 3547-3558, 2019.

LI, Z; CHEN, L; QIN, Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 6, n. 6, p. 415–422, 2009. DOI: 10.1038/cmi.2009.53.

LI, Z et al. Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer Research*, v. 68, n. 21, p. 8687–8694, 2008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0449.

LIE, S. S. et al. Purinergic signaling and interleukins in bladder cancer: mechanisms, interactions, and therapeutic potentials. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 143, n. 6, p. 1031-1042, 2017.

LOSENKOVA, C. et al. Compartmentalization of adenosine metabolism in cancer cells and its modulation during acute hypoxia. *Journal of Cell Science*, 2020. DOI: 10.1242/jcs.241463.

MALDONADO, P. et al. Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Amsterdã, v. 66, n. 1, p. 6–11, feb. 2012. DOI:10.1016/j.biopha.2011.09.007.

MASSÉ, K. et al. Ectophosphodiesterase/ nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 1, p. 181–193, 2010. DOI: 10.1387/ijdb.092879km.

MARTINS, C.C. et al. Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients. *Clinica Chimica Acta*, v. 454, p. 66-71, 2016. DOI: 10.1016/j.cca.2015.12.024.

MATULEWICZ, R.S.; STEINBERG, G. D. N—muscle-invasive Bladder Cancer: Overview and Contemporary Treatment Landscape of Neoadjuvant Chemoablative Therapies. *Reviews in Urology*, v. 22, n. 2, p. 43–51, 2020.

- MASTELIC-GAVILLET, Beatris et al. Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8+ T cells. **Journal of Immunotherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s40425-019-0719-5.
- MAYNARD, J. P. et al. P2 purinergic receptor dysregulation in urologic disease. **Purinergic Signalling**, v. 18, n. 3, p. 267-287, 2022.
- MICHAUD, J. P. et al. Purinergic signaling in cancer: emerging therapeutic targets. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 8, p. 1683-1697, 2011.
- MOCELLIN, S. et al. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 1, p. 61–76, 2004. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2003.11.001.
- MORELLO, S et al. Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2223, aug. 2021.
- MORI, T. et al. Bladder Cancer: Recent Advances and New Perspectives. **Journal of Urological Research**, v. 5, n. 2, p. 110-119, 1999.
- MOSSER, D. M. et al. Purinergic receptors in bladder cancer: insights into their roles and therapeutic potential. **Journal of Urology**, v. 180, n. 2, p. 526-533, 2008.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Bladder cancer. **National Cancer Institute**, 2022. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/bladder>. Acesso em: 15 jul. 2024.
- PARK, J. Y et al. The role of molecular markers in bladder cancer diagnosis and prognosis. **Journal of Urology**, v. 191, n. 2, p. 320-327, 2014.
- PATRITTI, A. Bladder Cancer: Epidemiology, Diagnosis, and Management. **European Urology Review**, v. 16, n. 2, p. 89-98, 2021.
- PAZ, J.V. et al. O desafio presente no diagnóstico e no tratamento do câncer de bexiga. *Research, Society And Development*, v. 11, n. 5, p. 5-17, 4 abr. 2022. **\*Research, Society and Development\***. DOI: 10.33448/rsd-v11i5.28252.
- PELEGRIN, P; SURPRENANT, A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1b release through pyrophosphatess. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 14, p. 2114-2127, 2009. DOI: 10.1038/emboj.2009.163.
- PELUZZO, A. M. et al. Challenging the Paradigm: Anti-Inflammatory Interleukins and Angiogenesis. **Cells**. v.8. ed .11(3) p.587, 2022. doi: 10.3390/cells11030587. PMID: 35159396; PMCID: PMC8834461.
- PETER, R. M. et al. Interleukins and purinergic signaling pathways in bladder cancer: insights into mechanisms and therapeutic approaches. **Journal of Urology**, v. 165, n. 2, p. 462-468, 2001.
- PIETROCOLA, F. et al. Purinergic signaling in bladder cancer: mechanisms and implications for therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 45613-45623, 2016.

PIRINÇCI, N. et al. Atividades séricas de adenosina desaminase, catalase e anidrase carbônica em pacientes com câncer de bexiga. **Clínicas (São Paulo)**, v. 67, p. 1443–1446, 2012. DOI: 10.6061/clinics/2012(12)15.

PULTI, R. S. et al. The role of purinergic signaling and interleukins in bladder cancer: insights and future directions. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, n. 4, p. 601–612, 2011.

QUADROS, A. R. et al. Toxicity evaluation of *Eleutherine plicata* Herb. extracts and possible cell death mechanism. **Toxicology Reports**. v.31. ed.8. p.1480-1487, 2021. doi: 10.1016/j.toxrep.07.015. PMID: 34401358; PMCID: PMC8353407.

ROBSON, S; SÉVIGNY, J; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006. DOI: 10.1007/s11302-006-9003-5

ROCKENBACH, L. et al. NTPDase3 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 são expressos diferencialmente durante a progressão do câncer de bexiga em camundongos. **Sinalização Purinérgica** v.10, p.421–430, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9405-8>

SAMADI, M. et al. Cancer immunotherapy focusing on the role of interleukins: A comprehensive and updated study. Pathology, **Research and Practice**, v. 249, p. 154732, 2023. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154732.

SATTO, A. A. et al. Bladder Cancer: Insights into Pathogenesis and New Therapeutic Strategies. **Urological Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 39, n. 5, p. 300–310, 2021.

SAWANT, D.V. et al. Adaptive plasticity of IL10+ and IL-35+ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. **Nature Immunology**, v. 20, n. 6, p. 724–735, 2019. DOI: 10.1038/s41590-019-0346-9.

SEIF, F. et al. Breast cancer tumor microenvironment affect Treg/IL-17-producing Treg/Th17 cell axis: Molecular and therapeutic perspectives. **Molecular Therapy – Oncolytics**, v. 28, p. 132-157, 2023. DOI: 10.1016/j.omto.2023.01.001.

SFANOS, K. S. et al. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 1, p. 11-24, jan. 2018.

SUFRIN, G. et al. Atividade da adenosina desaminase em pacientes com carcinoma de bexiga. **Journal of Urology**, 1978. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)57486-8.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, 2000. DOI: 10.1016/s0163-7258(00)00053-x.

THUN, M. J. et al.. E. Epidemiology of Bladder Cancer. In: KANTOFF, P. W.; CARROLL,

P. R.; D'AMICO, A. V. (Eds.). **Urologic Oncology**. 1. ed. Philadelphia: Elsevier, 2017. p. 123-145.

VAGUARI-TABARI, M et al. Molecular mechanisms and biological functions of exosomes in cancer development and progression. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2021.

VAUPEL, P; MULTHOFF, G. Accomplices of the Hypoxic Tumor Microenvironment Compromising Antitumor Immunity: Adenosine, Lactate, Acidosis, Vascular Endothelial Growth Factor, Potassium Ions, and Phosphatidylserine. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01887.

VASSALLO, R. et al. Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming **Journal of Immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 175, n. 4, p. 2684–2691, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.175.4.2684.

VENMAR, K. et al. Role of interleukins and purinergic signaling in bladder cancer: insights and therapeutic implications. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 8, p. 945-953, 2015.

VULTAGGIO-ROMA, V; SARTI, A; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. **Cells**, v. 9, n. 11, 2020. DOI: 10.3390/cells9112496.

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

WU, Y. et al. Purinergic signaling in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 83, 2020.

YEGUTKIN, G G et al. ATP and Adenosine Metabolism in Cancer: Exploitation for Therapeutic **Gain**. **Pharmacol Rev.** 2022 Jul; v. 74 ed. 3 p.797-822. doi: 10.1124/pharmrev.121.000528. PMID: 35738682; PMCID: PMC9553103.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.

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

ZERATI FILHO, M; NARDOZZA JÚNIOR, A; REIS, R. **Urologia fundamental**. São Paulo: Planmark, 2010.

ZHANG, X. et al. Purinergic receptors in bladder cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 2, p. 214-221, 2008.

ZHOU, Y. et al. Purinergic receptors and their roles in bladder cancer: a review. **Cancer Research**, v. 67, n. 11, p. 5286-5294, 2007

ZHULAI, G. et al. Adenosine-Metabolizing Enzymes, Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase, in Cancer. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, mar, 2022. DOI: 10.3390/biom12030418.

## ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFES

Prezado (a) participante, você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: Biorrepositório de biópsias tumorais para avaliação da expressão gênica e proteica dos receptores e enzimas do sistema purinérgico com ênfase em tumores de mama, próstata e colorretal, desenvolvida por discentes e docentes do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó – SC, sob coordenação da Professora Dra. Sarah F. V. O. Maciel.

**1. Objetivo Central** Construção e manutenção do Biorrepositório de amostras tumorais, a fim de pesquisar marcadores moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer, e com possibilidades de atuar no tratamento do câncer de mama, câncer de próstata, câncer colorretal e câncer de bexiga.

#### **2. Critérios de Inclusão**

**Pacientes:** ambos os sexos, diagnosticados por médico especialista com câncer de mama (do tipo carcinoma ductal invasor), câncer de próstata (do tipo adenocarcinoma), câncer colorretal (do tipo adenocarcinoma) e câncer de bexiga, maiores de 18 anos de idade, que até o momento não realizaram cirurgia para retirada do tumor e nenhum tipo de tratamento (quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia, imunoterapia, terapia de precisão). Serão excluídos pacientes com diagnóstico anterior de câncer, ou com doenças inflamatórias crônicas (diabetes, hipertensão, doença de chron, retocolite ulcerativa, hiperplasia prostática benigna, mastite).

**Controles:** com base no pareamento por idade (mais ou menos 3 anos) e sexo em relação aos pacientes, que não apresentem diagnóstico passado ou atual de câncer de qualquer tipo, ou de doenças inflamatórias crônicas. Sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se deseja ou não participar, além de poder desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de explicação. Você não receberá remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa.

**3. Mecanismos para garantir o sigilo e privacidade serão** garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. As amostras biológicas e os dados clinicopatológicos dos participantes serão identificados por numeração sequencial, não tendo vínculo com a identificação do paciente. A qualquer momento você poderá solicitar aos pesquisadores informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo. Caso ocorra desistência, os materiais biológicos e as informações clinicopatológicas dos participantes serão descartados.

**4. Identificação do participante ao longo do trabalho** Seu nome não será mencionado durante qualquer etapa desta pesquisa, bem como em quaisquer publicações, cursos, relatórios e afins. Apenas o nome da Instituição será mencionado. Para manter o seu anonimato, será utilizada uma codificação numérica sequencial. Cada participante terá um número distinto em todos os materiais e dados relacionados a ele.

**5. Tempo de duração da coleta/procedimento/experimento** A sua participação na pesquisa consiste em: 1. Pacientes - responder aos questionários de estilo e qualidade de vida; utilização do material tumoral e sanguíneo (30 ml) coletado durante a cirurgia de remoção do tumor, materiais que, normalmente, seriam descartados após análise patológica; disponibilização das

informações dos prontuários médicos (idade, sexo, subtipo histológico do tumor, estadiamento, etc). A pesquisa não irá gerar nenhum prejuízo no diagnóstico e tratamento da doença em questão; 2. Controles - responder aos questionários de estilo e qualidade de vida; utilização do material sanguíneo (30 ml) coletado durante a entrevista com os pesquisadores. As coletas serão realizadas pelos pesquisadores responsáveis e/ou médicos especialistas, em ambiente adequado no próprio HRO. O tempo de duração das coletas será de no máximo 30 minutos.

**6. Guarda dos dados e materiais coletados na pesquisa** Todos os materiais biológicos serão guardados em freezer, devidamente identificados com numeração sequencial, nome do projeto e pesquisador responsável. Os outros materiais provenientes da pesquisa ficarão guardados em armário trancado com chave, ao qual somente o pesquisador responsável terá acesso. As tabelas com informações dos participantes da pesquisa ficarão guardadas nos computadores dos pesquisadores envolvidos, com acesso somente com senha. Todos os materiais serão mantidos pelo período de duração da pesquisa (5 anos). Após o término da pesquisa, os materiais biológicos e dados clinicopatológicos serão descartados.

#### **7. Benefícios diretos (individuais ou coletivos) aos participantes da pesquisa**

Grupos de encontros com os participantes da pesquisa e outros pacientes do setor de Oncologia do HRO, de maneira voluntária por ambas as partes, em sala reservada no próprio HRO, onde serão dadas, por parte dos pesquisadores envolvidos, orientações e esclarecimentos sobre as patologias incluídas na pesquisa e compartilhamento de experiências, a fim de melhorar a qualidade de vida dos participantes. Posteriormente, esses grupos também permitirão o compartilhamento dos resultados obtidos na pesquisa, de maneira adequada para o entendimento por parte dos participantes.

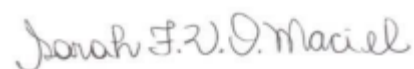
**8. Previsão de riscos ou desconfortos** A participação na pesquisa poderá causar riscos. Um risco previsível é o desconforto no momento da coleta de sangue, em decorrência da picada da agulha. Para minimizá-lo, a coleta será realizada por profissionais capacitados, visando a segurança dos participantes. Os pesquisadores explicarão detalhadamente o conteúdo da pesquisa e advertirão os participantes de que sua participação não é necessária caso não se sintam confortáveis para tal. Caso os riscos previstos ocorram, você receberá tratamento e acompanhamento até que esses desconfortos desapareçam. Outros danos que podem ser decorrentes da pesquisa são os psicológicos, visto que as patologias em questão podem provocar alterações psicossociais. Para minimizá-los, será explanado para os participantes o objetivo e finalidade da sua contribuição na pesquisa. Entretanto, caso sejam percebidos quaisquer distúrbios psicológicos no participante decorrente da pesquisa, este será encaminhado para o serviço de apoio psicológico do Centro de Saúde da Família (CSF) de referência, com a Equipe de Saúde da Família (ESF).

**9. Divulgação dos resultados da pesquisa** A devolutiva dos resultados obtidos na pesquisa será realizada por meio de publicações científicas e participação em eventos científicos da área, com palestras e com o uso de poster e banner ou informativos online. Os dados pessoais dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Caso concorde em participar, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Desde já agradecemos sua participação! Chapecó – SC, de de ..

Caso concorde em participar, concedendo amostra de sangue, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Não receberá cópia deste termo, mas apenas uma via. Desde já agradecemos sua participação!

Chapecó – SC, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.





Assinatura do Pesquisador Responsável

**Contato profissional com o(a) pesquisador(a) responsável:** Tel: 49-30254508/ e-mail: sarah.maciel@uffs.edu.br. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS: Tel e Fax - 49- 2049-3745/ e-mail: cep.uffs@uffs.edu.br.

**Endereço para correspondência:** Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, Universidade Federal da Fronteira Sul, Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, CEP 89815- 899, Chapecó, Santa Catarina, Brasil. Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome completo do participante e contato:

---

Assinatura:

---