

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

**CAMPUS CHAPECÓ**

**CURSO DE MEDICINA**

**LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA**

**NÁDIA CRISTINA PALOSCHI**

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

**CHAPECÓ-SC**

**2024**

**LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA**

**NÁDIA CRISTINA PALOSCHI**

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

Trabalho de Curso apresentado ao Curso de  
Graduação em Medicina da Universidade Federal  
da Fronteira Sul (UFFS) - *campus* Chapecó,  
como requisito para obtenção do título de  
Médico (a).

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Zanini

**CHAPECÓ-SC**

**2024**

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

Paloschi, Nádia Cristina

Avaliação da Atividade de Enzimas do Sistema  
Purinérgico e de Biomarcadores Inflamatórios em  
Pacientes com Câncer de Bexiga Não Invasivo / Nádia  
Cristina Paloschi, Luiz Alberto de Oliveira. -- 2024.  
41 f.:il.

Orientadora: Doutora Daniela Zanini

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2024.

1. Câncer de Bexiga. 2. Sistema Purinérgico. I.  
Oliveira, Luiz Alberto de II. Zanini, Daniela, orient.  
III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

**LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA**

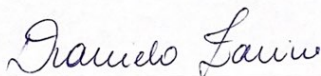
**NÁDIA CRISTINA PALOSCHI**

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

Trabalho de Curso apresentado ao Curso de Graduação  
em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul  
(UFFS) - *campus* Chapecó, como requisito para obtenção  
do título de Médico (a).

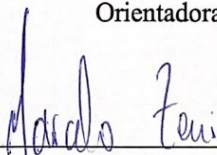
Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em: 19/06/2024

**BANCA EXAMINADORA**



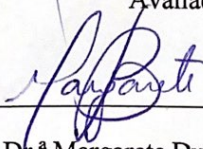
---

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



---

Prof. Dr. Marcelo Zeni - UFFS  
Avaliador



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margarete Dulce Bagatini - UFFS  
Avaliadora

## RESUMO

**Introdução:** O Câncer de Bexiga (CaB) é o primeiro tipo de câncer do trato urinário mais incidente na população mundial e o sexto mais incidente no sexo masculino. Vários estudos apresentam evidências de que o sistema purinérgico, em conjunto com a resposta tecidual à lesão e aos processos inflamatórios, estão entre as mais importantes vias de sinalização envolvidas na patogênese e na progressão do CaB. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de enzimas do sistema purinérgico em pacientes com CaB não invasivo, bem como os níveis de alguns biomarcadores inflamatórios nesses pacientes. **Metodologia:** Trata-se de um estudo quantitativo observacional transversal. Foram selecionados 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 adenosina deaminase (ADA) em linfócitos, 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. 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* 8.0.14. **Resultados:** 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 em linfócitos, está significativamente aumentada em pacientes com Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle. Na mesma análise, não houve diferença entre o grupo de pacientes com Estadiamento 0 em comparação ao grupo controle. Já, a atividade da E-NTPDase, para a hidrólise do ADP, apresentou-se aumentada tanto no Estadiamento 0 quanto no Estadiamento I, em comparação ao grupo controle. Sobre a ADA, a atividade está substancialmente aumentada no Estadiamento 0 e Estadiamento I, comparando-se ao grupo controle. Os níveis plasmáticos de IL-4, IL-6 e IL-10 foram maiores em pacientes com CaB não invasivo, em comparação com o grupo controle. **Discussão:** O CaB mostrou-se como um dos tumores mais comuns e letais, principalmente entre homens com idade avançada e tabagistas. Com relação à atividade das enzimas purinérgicas, nossos resultados demonstraram um aumento nas suas funções em pacientes com CaB não invasivo. 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 está associada a um pior prognóstico para o CaB, enquanto que a maior atividade da ADA está sendo fundamental para o controle da imunossupressão desenvolvida pela adenosina (Ado). 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. **Conclusão:** 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 Purinérgica; Linfócitos; Ectonucleotidases; Inflamação.

## ABSTRACT

**Introduction:** Bladder Cancer (Cab) is the first type of urinary tract cancer most incident in the world population and the sixth most incident in males. Several studies show evidence that the purinergic system, together with the tissue response to injury and inflammatory processes, are among the most important signaling pathways involved in the pathogenesis and progression of Cab. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the activity of purinergic system enzymes in patients with early-stage Cab, as well as the levels of some inflammatory biomarkers in these patients. **Methodology:** This is a cross-sectional observational quantitative study. We selected 29 patients diagnosed with Cab, prior to the beginning of any therapeutic intervention, and 36 control individuals, of a similar age group to the group of patients. The activities of the enzymes E-NTPDase and adenosine deaminase (ADA) in lymphocytes were evaluated, as well as the serum levels of IL-4, IL-6 and IL-10. The collection of biological material of the patients was performed at the premises of the Hospital Regional do Oeste, located in Chapecó/ SC. For the statistical analysis, first, the data were tested for their normality applied to the Shapiro-Wilk test. After, the Student's t-test and ANOVA One-way were used. The significance level used was 0.05 and the statistical program used was GraphPad Prism 8.0.1 4. **Results:** From the analysis of the results, the average age of patients with Cab was 69 9.2101 years and the control group was 70 8.4136 years. Regarding the group of patients with Cab, 18 (62.06%) were classified in Stage 0 and 11 (37.94%) were in Stage 1. E-NTPDase activity for ATP hydrolysis in lymphocytes is significantly increased in patients in Stage I, compared to the control group. In the same analysis in stage 0 there was no significant difference compared to the control group. On the other hand, the activity of E-NTPDase for the hydrolysis of ADP in lymphocytes was elevated in both stage 0 and stage I, compared to the control group. The activity of ADA in lymphocytes is substantially increased in stage 0 and stage I, compared to the control group. Plasma levels of IL-4, IL-6 and IL-10 were higher in patients with Cab compared to the control group. In addition, serum levels of IL-4, IL-6 and IL-10 were higher both in patients with stage 0 Cab and in patients with stage I Cab, compared to the control group. **Discussion:** Cab was one of the most common and lethal tumors, especially among older men and smokers. Regarding the activity of E-NTPDase and ADA in lymphocytes, our results demonstrated an increase in the activity of these enzymes in patients with early stage Cab. In addition, there was a sharp increase in NTPDase activity in lymphocytes for ADP hydrolysis in patients with Cab. Elevated E-NTPDase and ADA activity is associated with an advanced stage of tumors or a worse prognosis for Cab. In addition, early-stage Cab patients have high levels of IL-4, IL-6 and IL-10, which is related to tumor development and metastasis formation, and smoking is a factor that increases interleukin production, contributing to the incidence of Cab. **Conclusion:** The results showed that Cab directly alters the activity of enzymes of the purinergic system and serum inflammatory markers. These findings contribute to a better understanding of purinergic signaling and inflammatory processes in the pathophysiology of Cab, becoming an important tool for monitoring and therapy of these patients.

**Keywords:** Bladder Cancer, Purinergic Signaling, Lymphocytes, Ectonucleotidases, Inflammation.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Quadro 1 - Classificação TNM do Câncer de Bexiga pela UICC

Quadro 2 - Estadiamento do Câncer de Bexiga

Figura 1 - Principais componentes da sinalização purinérgica

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

Figura 2 - Atividade da enzima E-NTPDase em linfócitos de pacientes com CaB com estadiamento clínico 0 e I

Figura 2A - Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ATP

Figura 2B - Atividade da E-NTPDase para a hidrólise de ADP

Figura 3 - Atividade da ADA em linfócitos de pacientes com CaB com estadiamento clínico 0 e I

Figura 4 - Níveis plasmáticos de IL em pacientes com CaB

Tabela 2 - Síntese dos resultados das atividades enzimáticas e dos níveis de IL em pacientes com CaB e indivíduos controle

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |                                                |
|---------------|------------------------------------------------|
| ADA           | Adenosina deaminase                            |
| Ado           | Adenosina                                      |
| ADP           | Adenosina difosfato                            |
| ADK           | Adenosina quinase                              |
| AMP           | Adenosina monofosfato                          |
| APC           | Célula apresentadora de antígeno               |
| ATP           | Adenosina trifosfato                           |
| CaB           | Câncer de Bexiga                               |
| NMIBC         | Câncer de Bexiga não muscular invasivo         |
| MIBC          | Câncer de Bexiga muscular invasivo             |
| CEP           | Comitê de Ética em Pesquisa                    |
| CD73          | Ecto-5'-nucleotidase                           |
| CD 39         | E-NTPDase                                      |
| DAMPs         | Padrões moleculares associados ao dano         |
| E-NTPDase     | Ecto-nucleosídeos trifosfato difosfohidrolases |
| IL            | Interleucinas                                  |
| INCA          | Instituto Nacional do Câncer                   |
| MHC           | Complexo Principal de Histocompatibilidade     |
| HIF1 $\alpha$ | Fator 1 $\alpha$ induzível por hipóxia         |
| HRO           | Hospital Regional do Oeste                     |
| PCR           | Proteína C reativa                             |
| TCA           | Ácido tricloroacético                          |
| TCLE          | Termo de consentimento livre e esclarecido     |
| TNF $\alpha$  | Fator de necrose tumoral $\alpha$              |
| UFFS          | Universidade Federal da Fronteira Sul          |
| VEGF          | Fator de crescimento endotelial vascular       |



## SUMÁRIO

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                | <b>10</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                 | <b>18</b> |
| <b>3 METODOLOGIA.....</b>                                               | <b>18</b> |
| 3.1 DESENHO DO ESTUDO.....                                              | 18        |
| 3.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES.....                                       | 19        |
| 3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....                                         | 19        |
| 3.3.1 Coleta e processamento das amostras biológicas.....               | 19        |
| 3.3.2 Processamento e separação de linfócitos.....                      | 20        |
| 3.3.3 Dosagem de proteína.....                                          | 20        |
| 3.3.4 Determinação da atividade da E-NTPDase.....                       | 20        |
| 3.3.5 Determinação da atividade da ADA.....                             | 21        |
| 3.3.6 Quantificação de interleucinas plasmáticas.....                   | 21        |
| 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                                          | 22        |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>                                                | <b>22</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO.....</b>                                                 | <b>27</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>                                                 | <b>32</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                 | <b>33</b> |
| <b>ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b> | <b>38</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Bexiga (CaB) é reconhecido como um desafio no contexto da saúde pública, sendo o segundo câncer mais incidente do sistema geniturinário e o décimo primeiro câncer mais diagnosticado no mundo. Foi responsável por 220 mil mortes no ano de 2022, especialmente para a população masculina, na qual é o sexto câncer mais prevalente. Nesse contexto, o número de novos casos estimados de CaB no Brasil 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 (GLOBOCAN, 2022; INCA, 2023).

Nessa conjectura, a maioria dos casos de CaB estão associados a fatores de risco externos. Indo ao encontro dessa informação, a *International Agency for Research on Cancer* (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* sp. (Jubber *et al.*, 2023).

Nesse ínterim, o tabagismo ganha destaque, 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. Desse modo, o tabagismo está fortemente associado com a incidência de casos de CaB, sendo fator comum em mais de 50% dos indivíduos com esse diagnóstico, uma vez que ele proporciona o aumento de até quatro vezes a probabilidade de desenvolvimento de CaB em indivíduos fumantes, quando comparados aos não-fumantes (INCA, 2023; THUN *et al.*, 2017). 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).

Outrossim, é fundamental estadiar o CaB, 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, a 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.

Desse modo, podemos inicialmente diferir o CaB em dois tipos, sendo: a) 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; b) não muscular 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. Essa diferença quantitativa se justifica especialmente pelo contato direto do urotélio com a urina armazenada na bexiga contendo agentes nocivos e cancerígenos proveniente do metabolismo (CATTO *et al.*, 2021). Nesse contexto e não menos importante, os carcinomas de células escamosas e os adenocarcinomas demonstram 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* sp. (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 União Internacional para o Controle do Câncer (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). 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 transuretral (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 os estadiamentos para o CaB propostos pela UICC (2002).

Quadro 1 - Classificação TNM do Câncer de Bexiga pela UICC

| <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 - Estadiamento do Câncer de Bexiga

| <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 I – carcinoma urotelial papilífero de baixo grau e graus 2 e 3 – carcinoma papilífero de alto grau (ZERATI FILHO; NARDOZZA JÚNIOR; REIS, 2010).

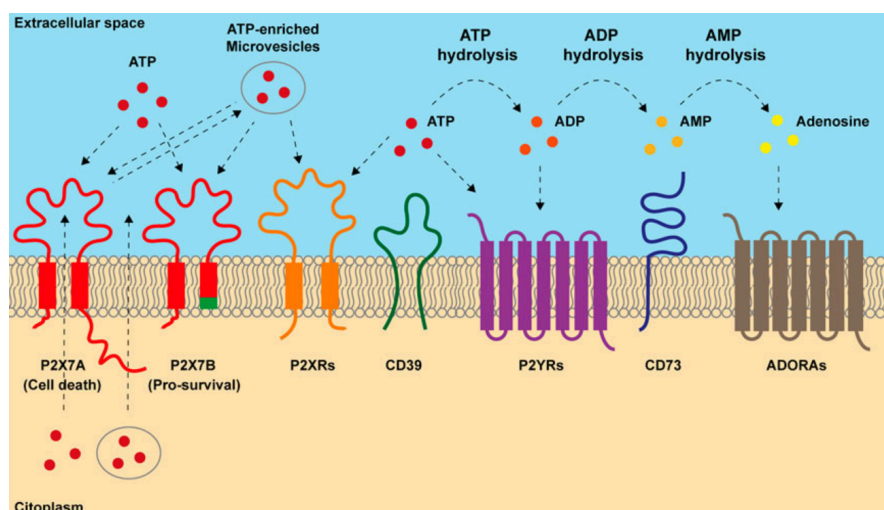
Além disso, apesar de algumas evidências já terem sido estabelecidas sobre a fisiopatologia do câncer de bexiga (CaB), a investigação e a compreensão dos mecanismos celulares que contribuem para o desenvolvimento dessa doença são de grande interesse para a comunidade médica. A literatura científica descreve 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 maligna e, conseqüentemente, a ocorrência de metástases (VAGHARI-TABARI et al., 2021). Nesse contexto, a sinalização purinérgica ganha destaque, com os estudos atuais demonstrando uma estreita relação entre os tumores neoplásicos, os processos de desenvolvimento e progressão cancerígena, 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 adenosina (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 e linfócitos, enquanto a CD73 é expressa no cólon, rim, cérebro, fígado, coração, pulmão e próstata (MORIWAKI et al., 1999; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

Ademais, no contexto do complexo e a sistema de sinalização purinérgica, ganha importância os receptores purinérgicos pertencentes às famílias: a) P1: (A2, A2A, A2B e A3); e b) P2 (P2X1-7 e P2Y 1, 2, 4, 6, 12, 14) (DI VIRGILIO, 2012), apresentamos a Figura 1:

Figura 1 - Principais componentes da sinalização purinérgica



Fonte: adaptado de Zanoni (2022).

**Figura 1** - 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).

Ademais, 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).

Nesse contexto, 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; KUMARI et al., 2016; GUO et al., 2019). A ação do ATP, durante o processo inflamatório, ocorre 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 adenosina (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 (MASTELIC-GAVILLE et al., 2019; CAMICI et al., 2019).

Adicionalmente, a ação da CD39 em linfócitos 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). 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).

Nesse contexto, 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 nos linfócitos 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 regulação 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 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 linfócitos de pacientes com diagnóstico de CaB em diferentes estadiamentos e em indivíduos controle;
- Avaliar a atividade da ADA em linfócitos de pacientes com diagnóstico de CaB em diferentes estadiamentos e em indivíduos controle;
- Dosar os níveis plasmáticos de IL-4, IL-6 e IL-10 em pacientes com diagnóstico de CaB e em indivíduos controle;

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 DESENHO DO ESTUDO**

Este projeto 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. Coletou-se material biológico no período de agosto de 2022 a dezembro de 2023, no qual se procedeu a avaliação da atividade das enzimas purinérgicas NTPDase e ADA em linfócitos, 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 A.

O sangue venoso coletado foi utilizado para o isolamento dos linfócitos e separação do 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.

### 3.2 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.

### 3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 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 EDTA como anticoagulante, para o isolamento dos linfócitos separação do plasma. 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 linfócitos e plasma foram armazenadas em microtubos tipo *ependorf*, identificados e congelados em freezer a -80°C.

### 3.3.2 Processamento e separação de linfócitos

Para o isolamento de linfócitos, as amostras de sangue com EDTA foram diluídas em volume igual de solução salina. Posteriormente, a amostra diluída foi transferida para um tubo cônico contendo Lymphoprep (*Ficoll-Histopaque*) e realizou-se centrifugação a 1800 rotações por minuto (rpm), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após a centrifugação, através da formação de um gradiente de densidade, é possível visualizar uma camada intermediária composta pelas células mononucleares (linfócitos e monócitos) entre as camadas de plasma e Ficoll. Esta nuvem de células foi cuidadosamente removida e transferida para tubo cônico limpo. Às células, foi adicionada solução salina e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1800 rpm. Na sequência, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 5 mL de tampão hemolítico aos linfócitos, procedendo nova centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de solução salina, homogeneizando o conteúdo e realizando-se nova centrifugação por 5 minutos a 1800 rpm. Após o término desse processo, os linfócitos foram guardados em eppendorfs contendo 600 uL de solução salina. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até a realização dos experimentos (Leal, 2005).

### 3.3.3 Dosagem de proteína

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

### 3.3.4 Determinação da atividade da E-NTPDase

A atividade de NTPDase, em linfócitos, foi realizada segundo Leal *et al.* (2005). Avaliou-se a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado usando-se um ensaio colorimétrico. Adicionou-se 20 uL de linfócitos a 160 uL do sistema de incubação da NTPDase e pré-incubados por 10 minutos a 37°C. Para a atividade de NTPDase o sistema de

incubação continha: NaCl 1200 mM, Glicose 600 mM, KCl 50 mM, tampão Tris HCl 500 mM pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 50mM e H<sub>2</sub>O Milli Q. A reação foi iniciada pela adição de 20 uL de ATP ou ADP, como substrato, a uma concentração final de 20 mM. A reação foi parada pela adição de 200 uL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. O Pi liberado pela hidrólise de ATP e ADP foi medido pelo método de Chan *et al.*, 1986. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em  $\lambda$  630 nm. Amostras de pacientes e controles foram realizadas em duplicatas. O controle da hidrólise não enzimática foi realizado conforme descrito para as amostras, porém sem adição de enzima. A atividade enzimática foi expressa em nmol Pi liberado/min/mg proteína.

### 3.3.5 Determinação da atividade da ADA

A atividade da ADA em linfócitos 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 UI/mg de proteína.

### 3.3.6 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™* (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.

### 3.4 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 CP 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% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Pela análise do Quadro 2 podemos observar dados relacionados às características gerais da população amostral tal como idade, gênero, 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 ( $70 \pm 8,41$ ).

Observou-se, também, que 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

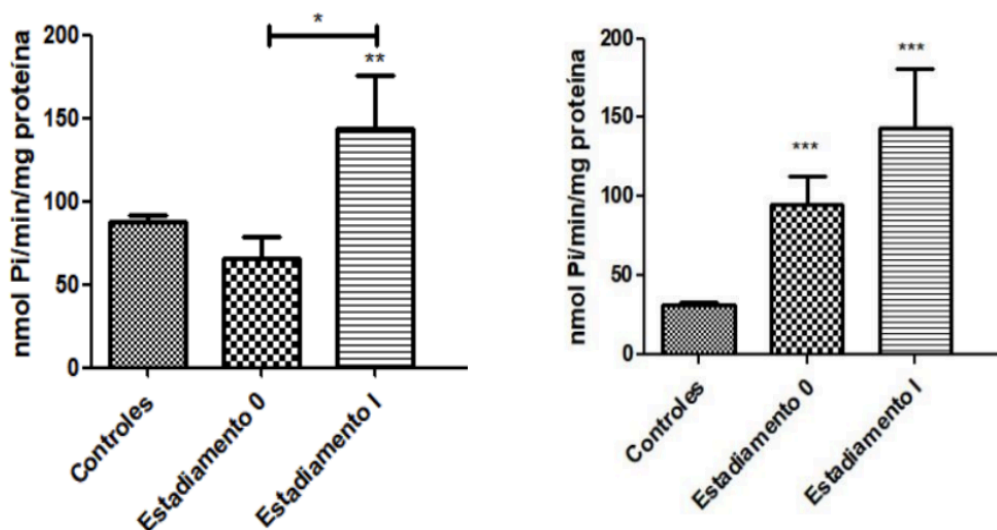
| <b>Características</b>                        | <b>Pacientes</b> | <b>Controles</b> |
|-----------------------------------------------|------------------|------------------|
| <b>Número amostral</b>                        | 29               | 36               |
| <b>Idade</b>                                  |                  |                  |
| 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>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).

#### 4.2 ATIVIDADE DA E-NTPDASE E DA ADA

Podemos observar, pela análise da Figura 2, a atividade da enzima E-NTPDase, em linfócitos, de pacientes em diferentes estadiamentos do CaB. A Figura 2A 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 no Estadiamento I do que no grupo de indivíduos controle [ $143.6 \pm 32.26$  vs.  $87.30 \pm 4.708$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,005$ ). Em relação aos pacientes no Estadiamento 0 do CaB, não houve diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo controle [ $65.78 \pm 13.10$  vs.  $87.30 \pm 4.708$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0 e no grupo controle, respectivamente] ( $p > 0,05$ ). A Figura 2B representa a atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ADP. Observou-se um aumento significativo tanto em pacientes com CaB em Estadiamento 0, quanto em pacientes com CaB no Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle [ $94.75 \pm 18.55$  vs.

$30.93 \pm 2.520$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0 e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ); [ $143.1 \pm 38.42$  vs.  $30.93 \pm 2.520$  nmol Pi/min/mg de proteína, em pacientes no Estadiamento I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ).

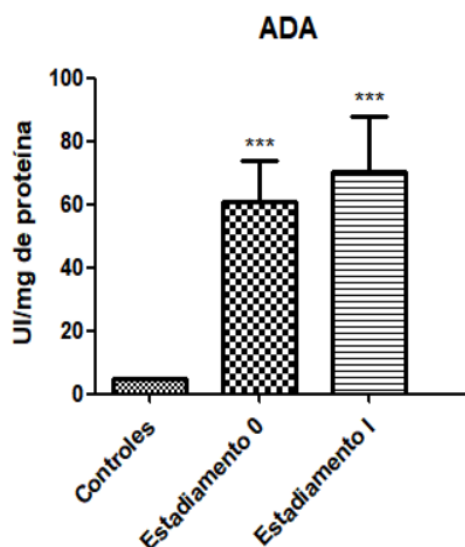


Fonte: Elaborada pelos autores (2024).

**Figura 2** - Atividade da enzima E-NTPDase em linfócitos de 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. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, ( $n = 36$ ) para controles, ( $n = 18$ ) para Estadiamento 0, ( $n = 11$ ) para Estadiamento I. \*\* $p \leq 0.005$ ; \*\*\* $p \leq 0.0005$ .

Pela análise da Figura 3 podemos observar a atividade da ADA, em linfócitos, de pacientes em diferentes estadiamentos do CaB. Observou-se um aumento na atividade tanto em pacientes com CaB em Estadiamento 0, quanto em pacientes com CaB no Estadiamento I, quando comparado com o grupo controle [ $60.86 \pm 13.22$  vs.  $4.691 \pm 0.3456$  UI/ mg de proteína, em pacientes no Estadiamento 0 e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ); [ $70.45 \pm 17.35$  vs.  $4.691 \pm 0.3456$  UI/ mg de proteína, em pacientes no Estadiamento I e no grupo controle, respectivamente] ( $p < 0,0005$ ).

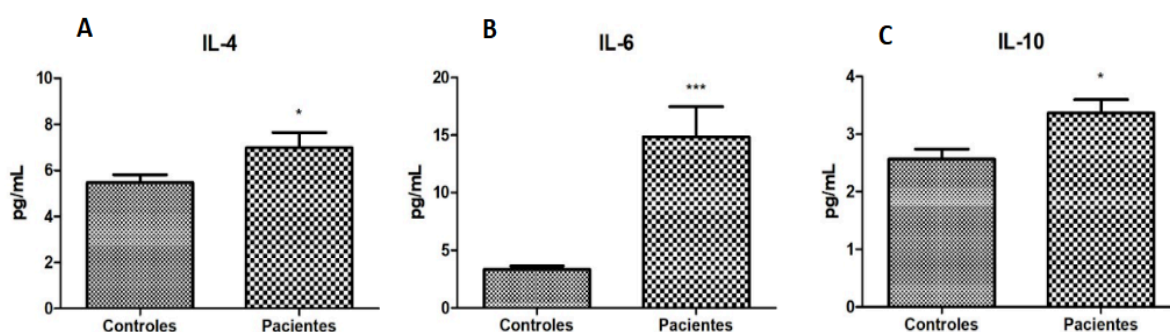




**Figura 3** - Atividade da ADA em linfócitos de pacientes com CaB com estadiamento clínico 0 e I. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, (n= 36) para controles, (n= 18) para Estadiamento 0, (n= 11) para Estadiamento I. \*\*\* $p \leq 0.0005$ .

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

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



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

No Quadro 3 está apresentada uma síntese dos principais resultados desse estudo.

Tabela 2 - Síntese dos resultados das atividades enzimáticas e dos níveis de IL em pacientes com CaB e indivíduos controle

| Análise em linfócitos              | Relação Pacientes/Controles | Média e DP Pacientes | Média e DP controles | p valor  |
|------------------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------|
| Hidrólise de ATP<br>estadiamento 0 | =                           | 65.78 ± 13.10        | 87.30 ± 4.708        | 0,0642   |
| Hidrólise de ATP<br>estadiamento I | ↑ ↑                         | 143.6 ± 32.26        | 87.30 ± 4.708        | 0,0048   |
| Hidrólise de ADP<br>estadiamento 0 | ↑ ↑ ↑                       | 94.75 ± 18.55        | 30.93 ± 2.520        | < 0,0001 |
| Hidrólise de ADP<br>estadiamento I | ↑ ↑ ↑                       | 143.1 ± 38,42        | 30.93 ± 2.520        | < 0,0001 |
| Atividade da ADA<br>estadiamento 0 | ↑ ↑ ↑                       | 60.86 ± 13.22        | 4.691 ± 0.3456       | < 0,0001 |
| Atividade da ADA<br>estadiamento I | ↑ ↑ ↑                       | 70.45 ± 17.35        | 4.691 ± 0.3456       | < 0,0001 |

| Análise em plasma | Relação Pacientes/Controles | Média e DP Pacientes | Média e DP Controles | p valor  |
|-------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------|
| IL-4              | ↑                           | 6.979 ± 0.7140       | 5.470 ± 0.3350       | 0,0397   |
| IL-6              | ↑ ↑ ↑                       | 14.85 ± 2.611        | 3.350 ± 0.3011       | < 0,0001 |
| IL-10             | ↑                           | 3.364 ± 0.2321       | 2.564 ± 0.1750       | 0,0235   |

Fonte: Elaborado pelos autores (2024)  
Nota: DP - desvio padrão.

## 5 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 ADA em linfócitos, 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 IL-2 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 I do CaB, em comparação com os pacientes no Estadiamento 0. 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, sendo posteriormente hidrolisados em ADP e AMP, 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 níveis elevados de expressão de enzimas geradoras de adenosina ou receptores de adenosina à má 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).

Este trabalho também revelou que a atividade da E-NTPDase em linfócitos, 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, pode-se 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 Inosina (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).

Este estudo demonstrou que a atividade da ADA está aumentada no subtipo não invasivo do CaB, controlando, desse modo, os altos níveis de Ado que são gerados pela atuação em sequência das enzimas que hidrolisam os nucleotídeos de adenina. Esse mecanismo poderia controlar a progressão tumoral, ainda visando evitar a invasão de tecidos adjacentes e um pior prognóstico. Ainda, pode-se prever que o acúmulo posterior de Ado, provavelmente devido ao esgotamento da atividade de ADA em tumores de estágios mais avançados, resulte em linfotoxicidade, promovendo imunodeficiência combinada grave (ZANINI *et al.*, 2019).

No mesmo sentido, autores identificaram que os níveis de ADA em linfócitos de 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 em linfócitos podem servir como indicadores sensíveis para o CaB (SUFRIN *et al.*, 1978; PIRINÇÇI *et al.*, 2012). Por outro lado, há estudos que mostraram que o aumento da atividade da ADA estava diretamente associado ao estágio do CaB, indicando que esse aumento era proporcional à massa tumoral primária (BLECHIOR *et al.*, 2012).

Em relação às interleucinas, os 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 pró-carcinogênica, através da indução da sinalização de fosfoinosítídeo 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 IL-10, 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 ambiguidade 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 sobrevida.

## **6 CONCLUSÃO**

Pela primeira vez foi possível relacionar a atividade da E-NTPDase e da ADA com diferentes estadiamentos tumorais no CaB. Notavelmente, essa patologia altera significativamente a atividade das enzimas do sistema purinérgico em linfócitos, 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 maior atividade da ADA será responsável pelo consumo da Ado, protegendo o organismo das ações imunossupressoras dessa molécula e melhorando a vigilância imune frente ao desenvolvimento tumoral. Esse fato pode ser justificado pelo perfil de pacientes incluídos em nosso estudo, ou seja, indivíduos com CaB não invasivo. 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 no controle do desenvolvimento e da progressão do CaB.



## REFERÊNCIAS

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, Soghra; SABOURY, Ali Akbar; HAERTLÉ, Thomas. Adenosine deaminase inhibition. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 141, p. 1246-1257, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.078.

BATTISTI, Vanessa; MADERS, Liési; BAGATINI, Margarete; BATTISTI, Iara; BELLÉ, Luziane; SANTOS, Karen; MALDONADO, Paula; THOMÉ, Gustavo; SCHETINGER, Maria; MORSCH, Vera. 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.

BAUNER, Christoph; CRAGO, Christine L. Adoption of residential solar power under uncertainty: Implications for renewable energy incentives. **Energy Policy**, v. 86, p. 27–35, 2015. DOI: 10.1016/j.enpol.2015.06.009.

BELCHIOR, Ana; LOBÃO, Renato; FERREIRA, Maria C. Determination of adenosine deaminase activity in the sera of patients with bladder cancer. **Clinics**, São Paulo, v. 67, n. 12, p. 1449-1454, 2012. DOI: [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(12\)15](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(12)15).

BISWAS, Subhra K. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 435–449, 2015. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.09.001.

BORTH, Marcio. Atividade das enzimas do sistema purinérgico e sua associação com os níveis de PSA, o escore de Gleason e a classificação tumoral em pacientes com câncer de próstata. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2023.

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, 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.

BURT, Bryan; RODIG, Scott; TILLEMANN, Tamara et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cells predict survival in human pleural mesothelioma. **Cancer**, v. 117, n. 22, p. 5234–5244, 2011. DOI: 10.1002/cncr.26143.

CAMICI, Marcella et al. Purine-Metabolising Enzymes and Apoptosis in Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 9, sep. 2019. DOI: 10.3390/cancers11091354.

CATTO, James et al. Cistectomia radical contra BCG intravesical para câncer de bexiga invasivo não muscular de alto risco: resultados do estudo de viabilidade BRAVO controlado randomizado. **Revista de Oncologia Clínica**, v. 3, pág. 202-214, 2021. DOI: 10.1200/JCO.20.01665.

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, Davilyn. Riscos prevalentes para câncer de bexiga: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, n. 1, p. 28-31, 14 nov. 2021. Revista Brasileira de Analises Clinicas. DOI: 10.21877/2448-3877.202101991.

DING, Yuan Yi 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.

DI VIRGILIO, Francesco. 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.

DI VIRGILIO, Francesco. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 2012. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1600.

DI VIRGILIO, Francesco; ADINOLFI, Elena. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogenes**, v.36, p. 1-11, 2017. DOI: 10.1038/onc.2016.206.

DI VIRGILIO, Francesco; SARTI, Alba Clara; COUTINHO-SILVA, Robson. Purinergic signalling, DAMPs, and inflammation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 5, p. C832-C835, 2020. DOI: 10.1152/ajpcell.00053.2020.

DI VIRGILIO, Francesco; SARTI, Alba Clara.; FALZONI, Simoneta; DE MARCHI, Elena; ADINOLFI, Elena. 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.

DONG, Changming; HUI, Pengyu; WU, Zhengqi; 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.

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. DOI: 10.5935/1676-2444.20190029.

GIOVARELLI, M.; MUSIANI, P.; MODESTI, A.; 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.

GONZALEZ, Eric; ARMS, Lauren; VIZZARD, Margaret A. The role(s) of cytokines/chemokines in urinary bladder inflammation and dysfunction. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/120525.

GUO, Manman; HÄRTLOVA, Anetta; GIERLIŃSKI, Marek; et al. Triggering MSR1 promotes JNK-mediated inflammation in IL-4-activated macrophages. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 11, 2019. DOI: 10.15252/embj.2018100299.

HESSE, Júlia 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.

JUBBER, Ibrahim et al. Epidemiologia do câncer de bexiga em 2023: uma revisão sistemática dos fatores de risco. **Urologia Europeia**, 2023. DOI: 10.1016/j.eururo.2023.03.029.

KALJAS, Y.; LIU, C.; SKÁLDIN, M.; WU, C.; ZHOU, Q.; LU, Y.; AKSENTIJEVICH, I.; ZAVIALOC, A. 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, Oliver; BEZU, Lucillia; YAMAZAKI, Takahiro; et al. ATP and cancer immunosurveillance. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 13, 2021. DOI: 10.15252/embj.2021108130.

KIM, Kyoung; HUSSEIN, Osama; PARK, See-Hyoung; et al. Expression of IL4R $\alpha$  and IL13R $\alpha$ 1 are associated with poor prognosis of soft-tissue sarcoma of the extremities, superficial trunk, and retroperitoneum. **Diagnostic Pathology**, v. 16, n. 2, 2021. DOI: 10.1186/s13000-020-01066-z.

KNOCHELMANN, Hannah M.; DWYER, Connor J.; SMITH, Aubrey S.; 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, Neeraj; DWARAKANATH, B. S.; DAS, Asmita; 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.

KUMARI, Nitu; AGRAWAL, Usha; MISHRA, 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: 10.10428317697552.

KUNZLI, Bata 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.

LI, Zhiguang; CHEN, Lin; QIN, Zhihai. 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, Zhiguang; JIANG, Jing; WANG, Zibing; 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.

LOSENKOVA, Carolina; ZUCCARINI, Mariachiara; KARIKOSKI, Marika; LAURILA, Juha; BOISON, Detlev; JALKANEN, Sirpa; YEGUTKIN, Gennady. Compartmentalization of adenosine metabolism in cancer cells and its modulation during acute hypoxia. **Journal of Cell Science**, 2020. DOI: 10.1242/jcs.241463.

MALDONADO, Paula; PIMENTEL, Victor; NEGRINI, Luiz Augusto 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.

MARTINS, Caroline Curry 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.

MASSÉ, Karine; BHAMRA, Surinder; ALLSOP, Gavin; 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.

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.

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

MAYNARD, Janielle; SFANOS, Karen. P2 purinergic receptor dysregulation in urologic disease. **Purinergic Signalling**, v. 18, n. 3, p. 267-287, set. 2022. DOI: 10.1007/s11302-022-09875-1.

MOCELLIN, Simone; MARINCOLA, Francesco; ROSSI, Carlo Riccardo; 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.

MOCELLIN, Simone; PANELLI, Monica C.; WANG, Ena; et al. The dual role of IL-10. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 36–43, 2003. DOI:10.1016/s1471-4906(02)00009-1.

PAZ, João Victor 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, Pablo; SURPRENANT, Annmarie. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1b release through pyrophosphatases. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 14, p. 2114-2127, 2009. DOI: 10.1038/emboj.2009.163.

PELUZZO, Amanda et al. Challenging the Paradigm: Anti-Inflammatory Interleukins and Angiogenesis. **Cells**, v. 8, ed. 11, p. 587, 2022. DOI: 10.3390/cells11030587.

PIRINÇCI, Necip; GEÇIT, İlhan; GÜNES, Mustafa; YUKSEL, Mehmet; KABA, Mehmet; TANIK, Serhat; DEMİR, Halit; ASLAN, Mehmet. 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.

QUADROS, Antonio 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.

ROBSON, Simão; SÉVIGNY, Jean; ZIMMERMANN, Herbert. 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.

SAMADI, Mahmoud; KAMRANI, Amin; NASIRI, Hadi; 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.

SAWANT, Deepali V.; YANO, Hiroshi; CHIKINA, Maria; et al. Adaptive plasticity of IL-10+ 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, Farhad 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.

SILVA, Álisson Coldebella da. Investigação da modulação do sistema purinérgico sobre a resposta celular a quimioterápicos em linhagens de câncer de bexiga. 2023. Dissertação (Pós-Graduação em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2023.

SUFRIN, Gerald; TRITSCH, George; MITTELMAN, Arnold; MURPHY, Gerald. Atividade da adenosina desaminase em pacientes com carcinoma de bexiga. **Journal of Urology**, 1978. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)57486-8.

SMITH, Peter; HOBISCH, Alfred; LIN, Din-Lii; et al. Interleukin-6 and prostate cancer progression. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 12, n. 1, p. 33–40, 2001. DOI: 10.1016/s1359-6101(00)00021-6.

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

VAUPEL, Pedro; MULTHOFF, Gabriele. 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, Robert; TAMADA, Koji; LAU, Julie S.; 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.

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

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

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

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

ZANONI, Michele; PEGORARO, Anna; ADINOLFI, Elena; et al. Emerging roles of purinergic signaling in anti-cancer therapy resistance. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022. DOI: 10.3389/fcell.2022.1006384.

ZERATI FILHO, Miguel; NARDOZZA JÚNIOR, Archimedes; REIS, Rodolfo. **Urologia fundamental**. São Paulo: Planmark, 2010.

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

## ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Comitê de Ética em Pesquisa — CEP/UFS

Prezado (a) participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: Banco de Biópsias 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 Banco de biópsias tumorais, que permitirão avaliar a expressão gênica (qRT-PCR) e proteica (*western blot*) dos receptores purinérgicos P1 e P2 (A2A, P2X7, P2Y6, P2Y12, P2Y2), e das ectonucleotidases (E-NTPDase CD39, E-NPP, 5'- Nucleotidase CD73, adenosina deaminase - ADA) em amostras sanguíneas e tumorais de pacientes com CM (carcinoma ductal invasor), CP (adenocarcinoma) e CCR (adenocarcinoma).

### **2. Critério de Inclusão**

Pacientes: voluntários acima de dezoito (18) anos que tenham sido diagnosticados por médico especialista com carcinoma mamário ductal invasor, adenocarcinoma prostático ou adenocarcinoma colorretal (sem origem familiar), conforme CID 10, e que não tenham realizado a remoção do tumor ou iniciado tratamento farmacológico. Controles: voluntários acima de dezoito (18) anos que não possuam patologias ativas ou 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. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa. 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. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa. A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar aos pesquisadores informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser efetuado através dos meios de contato explicitados neste Termo.

### **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. Cada participante terá um número distinto.

### **5. Tempo de duração da coleta/procedimento/experimento**

A sua participação na pesquisa consiste em: 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. As coletas serão realizadas pelos pesquisadores responsáveis e/ou médicos especialistas, em ambiente adequado. O tempo de duração das coletas será de no máximo 30 minutos.

### **6. Guarda dos dados e materiais coletados na pesquisa**

As amostras e demais materiais coletados durante a pesquisa farão parte do Banco de biópsias tumorais da UFFS campus Chapecó, e serão mantidos em freezer, arquivo, físico ou digital, por um período de no mínimo cinco (5) anos. Apenas os pesquisadores e a orientadora terão acesso às amostras e demais dados. Os materiais e informações clinicopatológicas coletados serão mantidos para além do tempo dessa pesquisa, podendo ser utilizados em pesquisas futuras que avaliem outros biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e terapêutica envolvidos na carcinogênese e progressão tumoral.

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

O benefício relacionado com a sua colaboração nessa pesquisa é o aprofundamento dos conhecimentos sobre a ação do Sistema Purinérgico no contexto do câncer esporádico. Dessa forma, torna-se possível progredir nos aspectos relacionados ao tratamento e, consequentemente, prognóstico da condição.

### **8. Previsão de riscos ou desconfortos**

A participação na pesquisa poderá causar riscos. Um risco previsível neste caso é o desconforto no momento da coleta de sangue, em decorrência da picada da agulha. O risco será minimizado, pois 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. Por exemplo, caso haja hematoma no local da coleta de sangue, você será acompanhado até que esse hematoma desapareça.

### **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 pôster e banner ou informativos online. Os dados pessoais dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

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.maciell@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](mailto: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.