



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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA
PURINÉRGICO NO MICROAMBIENTE TUMORAL E O ESTRESSE OXIDATIVO
EM INDIVÍDUOS COM NEOPLASIA DE BEXIGA**

EDUARDA VALCARENGHI JABONSKI

CHAPECÓ - SC
2025

EDUARDA VALCARENGHI JABONSKI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA
PURINÉRGICO NO MICROAMBIENTE TUMORAL E O ESTRESSE OXIDATIVO
EM INDIVÍDUOS COM NEOPLASIA DE BEXIGA**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

CHAPECÓ - SC

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Jabonski, Eduarda Valcarenghi

Análise da expressão gênica de componentes do Sistema Purinérgico no microambiente tumoral e o estresse oxidativo em indivíduos com neoplasia de bexiga / Eduarda Valcarenghi Jabonski. -- 2025.

52 f.:il.

Orientadora: Doutora Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Chapecó, SC, 2025.

1. Neoplasias da Bexiga Urinária. 2. Agentes purinérgicos. 3. Dano oxidativo. 4. Microambiente tumoral. I. Maciel, Sarah Franco Vieira de Oliveira, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

2025

EDUARDA VALCARENGHI JABONSKI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA
PURINÉRGICO NO MICROAMBIENTE TUMORAL E O ESTRESSE OXIDATIVO
EM INDIVÍDUOS COM NEOPLASIA DE BEXIGA**

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

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 31/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA MACIEL
Data: 01/09/2025 22:22:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel - UFFS
Orientadora - Presidenta da Banca

Prof.^a Dr.^a Andréia Machado Cardoso - UFFS
Avaliadora Interna

Prof.^a Me. Marcelo Zeni - HRO
Avaliador Externo

Prof.^a Dr.^a Debora Tavares de Resende e Silva - UFFS
Avaliadora Suplente

Dedico este trabalho a todos os voluntários, em especial, aos que mesmo em seu momento de fragilidade e diagnóstico de câncer deram vida a este estudo.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me guiar até aqui. Aos mestres que compartilharam seus conhecimentos e vivências tornando essa caminhada ainda mais enriquecedora, minha eterna gratidão. A minha orientadora Prof^a Dr^a Sarah que me incentivou a buscar respostas e impulsionou pelo caminho da ciência desde a graduação, serei sempre grata. A minha família pelo apoio incondicional e paciência pelos momentos de ausência em virtude da caminhada acadêmica, em especial, o meu marido, que foi suporte, abrigo e não mediu esforços para me auxiliar, amo todos vocês. A Universidade Federal da Fronteira Sul e à todos aqueles que lutaram para sua existência, consolidação e expansão sou grata pela oportunidade de aprender e me desenvolver enquanto profissional, mas também, como ser humano em uma universidade pública, gratuita e de qualidade.

Aos colegas de pesquisa, em especial, Vandriel Pedone da Rosa e Filomena Marafon, que se dispuseram a auxiliar em diversas etapas dessa pesquisa e tornaram a caminhada mais leve, meu muito obrigada! Aos indivíduos que se disponibilizaram a participar voluntariamente nos grupos estudados, nosso agradecimento, por fazerem parte deste estudo precursor e nossa estima que estes dados impulsionem novas pesquisas na área e façam coro com os estudos já existentes.

RESUMO

A sinalização purinérgica (SP) e o estresse oxidativo (EO) desempenham papéis centrais na regulação do microambiente tumoral, influenciando processos como proliferação celular, inflamação e evasão da resposta imune. Este estudo teve como objetivo avaliar marcadores da via purinérgica e de EO. Foram considerados estatisticamente significativos resultados com valor de $p < 0,05$. Os resultados demonstraram redução da expressão gênica de NTPDase-1 (CD39) ($p=0,0269$) e do receptor A2A ($p=0,0273$) no tecido tumoral, em relação ao tecido não tumoral, acompanhada de aumento do ATP extracelular (ATPe) no ambiente sistêmico do grupo câncer de bexiga (CaB) ($p < 0,0001$). A expressão de Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) permaneceu inalterada entre tecido tumoral e não tumoral ($p=0,2510$), sugerindo possível manutenção da produção de adenosina. Observou-se ainda elevação da expressão proteica de CD39 no ambiente sistêmico (PBMCs) de pacientes com câncer não músculo invasivo (NMI) ($p=0,0353$), indicando um possível mecanismo compensatório. Quanto ao EO, o grupo CaB apresentou aumento dos níveis de Malondialdeído (MDA) ($p=0,0253$), redução dos tióis proteicos ($p=0,0404$) e elevação dos níveis de vitamina C ($p=0,0293$), o que sugere uma tentativa de resposta antioxidante frente ao desequilíbrio redox. Em conjunto, os dados apontam para uma desregulação compartimentalizada, ou seja, com vias distintas no ambiente sistêmico em relação ao microambiente tumoral da via purinérgica e do balanço redox em pacientes com CaB, revelando potenciais biomarcadores moleculares e bioquímicos que podem auxiliar no prognóstico e na estratificação terapêutica da doença.

Palavras-chave: Neoplasias da Bexiga Urinária; Agentes purinérgicos; Dano oxidativo; Microambiente tumoral.

ABSTRACT

Purinergic signaling (PS) and oxidative stress (OS) play central roles in regulating the tumor microenvironment, influencing processes such as cell proliferation, inflammation, and immune evasion. This study aimed to evaluate markers of the purinergic pathway and OS. Results with a p-value of <0.05 were considered statistically significant. The results showed reduced gene expression of NTPDase-1 (CD39) ($p=0.0269$) and the A2A receptor ($p=0.0273$) in tumor tissue compared to non-tumor tissue. This was accompanied by an increase in extracellular ATP (ATPe) in the systemic environment of the bladder cancer (BC) group ($p<0.0001$). Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) expression remained unchanged between tumor and non-tumor tissue ($p=0.2510$), suggesting a possible maintenance of adenosine production. An elevation in CD39 protein expression was also observed in the systemic environment (PBMCs) of patients with non-muscle-invasive (NMI) cancer ($p=0.0353$), indicating a possible compensatory mechanism. Regarding OS, the BC group showed increased levels of Malondialdehyde (MDA) ($p=0.0253$), a reduction in protein thiols ($p=0.0372$), and elevated vitamin C levels ($p=0.0293$). This suggests an attempted antioxidant response to the redox imbalance. Collectively, the data point to a compartmentalized deregulation, with distinct purinergic pathway and redox balance pathways in the systemic environment compared to the tumor microenvironment in BC patients. This reveals potential molecular and biochemical biomarkers that could aid in the prognosis and therapeutic stratification of the disease.

Keywords: Urinary Bladder Neoplasms; Purinergic Agents; Oxidative Damage; Tumor Microenvironment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estadiamento clínico associado ao TNM no câncer de bexiga	17
Figura 2- Componentes do Sistema Purinérgico	20
Figura 3- Estresse oxidativo	21
Figura 4- ATP extracelular	32
Figura 5- Expressão de CD39	33
Figura 6- Marcadores oxidativos	31
Figura 7- Marcadores antioxidantes	32
Figura 8- Correlação entre ATPe e CD39	34
Figura 9- Expressão gênica no microambiente tumoral	34
Figura 10- Interação entre estresse oxidativo, sinalização purinérgica e inflamação, repercussões no câncer de bexiga	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características epidemiológicas e histológicas do grupo CaB	30
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação TNM do Câncer de Bexiga	18
--	----

LISTA DE SIGLAS

ADA - Adenosina deaminase

ADP - Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

CaB - Câncer de bexiga

Ca²⁺ Cálcio

CAT - Catalase

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CID - Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde

Cl⁻ - Ânion Cloreto

DNA - Ácido desoxirribonucleico

e5NT/CD73 - Ecto-5'-nucleotidase

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

E-NTPdase - Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

GLUT-1 - Transportador de Glicose 1

GSH - Glutathione

GST - Glutathione S-Transferase

GPx - Glutathione peroxidase

HClO - Ácido Hipocloroso

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HRO - Hospital Regional do Oeste

MPO - Mieloperoxidase

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida

NOCs - Compostos N-nitrosos

NO - Óxido nítrico

NPSH - Tióis não protéicos

O₂ - Oxigênio

O₂^{•-} - Ânion superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

PSH - Tióis proteicos

TxA2 - Tromboxano A2

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro

SC - Santa Catarina

Se - Selênio

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Ácido tiobarbitúrico

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNM - Tumor, Nódulos (metástases linfonodais) Metástases a distância

UFFS - Universidade Federal da Federal da Fronteira Sul

VIT C -Vitamina C

VIT E - Vitamina E

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVO GERAL.....	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 O CÂNCER DE BEXIGA.....	16
3.2 O SISTEMA PURINÉRGICO E O CÂNCER DE BEXIGA.....	19
3.3 IMPLICAÇÕES DO ESTRESSE OXIDATIVO NO CÂNCER DE BEXIGA.....	20
3.4 RELAÇÃO DO SP COM O EO NO CÂNCER DE BEXIGA.....	22
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	24
4.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES.....	24
4.2.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	25
4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	25
4.5.1 Coleta e processamento das amostras biológicas.....	25
4.5.2 Processamento do sangue periférico.....	26
4.5.3 Expressão gênica por RT-qPCR.....	26
4.5.3 Expressão proteica por citometria de fluxo.....	27
4.5.4 Perfil Redox.....	28
4.5.4.1 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	28
4.5.4.2 Detecção de EROs.....	28
4.5.4.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	28
4.5.4.4 Níveis de tiol total (PSH) e tiol não proteico (NPSH).....	28
4.5.4.5 Teor de VIT C (ácido ascórbico).....	29
4.5.5 Determinação de ATP.....	29
4.5.7 Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	30
5.2 PERFIL REDOX.....	31
5.2.1 Pacientes com CaB demonstraram níveis aumentados de MDA.....	31
5.2.2 O grupo CaB apresenta redução dos níveis de PSH.....	31
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE ATP.....	32
5.4 EXPRESSÃO PROTEICA DE CD39.....	33
5.5 NÃO HOUE CORRELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE ATPe E A EXPRESSÃO DE CD39.....	33
5.6 PACIENTES COM CaB APRESENTAM REDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CD39 E A2A NO MAT.....	34
6 DISCUSSÃO.....	35

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial tanto pela alta incidência quanto pelo índice elevado de mortalidade associado. Nesse cenário, o câncer de bexiga (CaB) é o 12º em termos de incidência no Brasil, desconsiderando os tumores de pele não melanoma. A estimativa é de que no triênio 2023-2025 seja alcançada a marca de mais de 11 mil novos casos por ano (INCA, 2022).

O CaB é uma das neoplasias urológicas mais prevalentes em todo o mundo, caracterizado por alta taxa de recorrência e progressão, especialmente nos casos músculo-invasivos (MI) (FERLAY et al., 2021). Atinge com mais frequência os homens, mundialmente foi a sexta neoplasia mais frequente entre esse grupo (DOBRUCH; OSZCZUDLOWSKI, 2021). No tocante à mortalidade foram mais de quatro mil óbitos registrados no Brasil em 2020 por essa neoplasia (INCA, 2022). Salienta-se que a região Sul do país é a região com a incidência mais alta da doença, 10,43 por 100 mil habitantes (INCA, 2022).

Assim como as demais neoplasias, a de bexiga é uma doença multifatorial. Destaca-se que os fatores modificáveis são fortemente ligados a essa condição, obesidade, consumo de carne vermelha, álcool e, especialmente, o tabagismo são discutidos como predisponentes da doença (DOBRUCH; OSZCZUDLOWSKI, 2021). A distinção entre os subtipos não músculo-invasivo (NMI) e MI é fundamental para a definição terapêutica e prognóstica, exigindo abordagens moleculares que auxiliem na compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese e na evasão imune (KIRKALI et al., 2005).

O sistema purinérgico (SP), por sua vez, conceitua-se como uma via de regulação da homeostase imunológica através de diversas moléculas e receptores, destacando-se a produção de quimiocinas, citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (ANTONIOLI et al., 2019). Entre os processos que contribuem para a modulação do microambiente tumoral (MAT), a sinalização purinérgica tem ganhado destaque nas últimas décadas. Essa via é mediada por nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, como a Adenosina trifosfato (ATP) e a adenosina (Ado), que atuam como importantes reguladores da inflamação, proliferação celular e resposta imune (DI VIRGILIO et al., 2020). Enzimas como NTPDase-1 (CD39) e Ecto-5'-nucleotidase (CD73) atuam sequencialmente na conversão do ATP em Adenosina (Ado), sendo esta última capaz de exercer efeitos imunossupressores, principalmente por

meio da ativação do receptor A2A (ADORA2A) em células do sistema imune (ALLARD et al., 2017; LINDEN; CUBILLOS-ROBLEDO; CHOWDHURY, 2022).

O acúmulo de ATP extracelular (ATPe), por sua vez, está frequentemente associado à presença de dano celular e hipóxia, podendo atuar como um sinal de perigo (padrões moleculares associados a danos (DAMP)) e intensificar a inflamação tumoral (ANTONIOLI et al., 2016). A via purinérgica, portanto, participa ativamente do equilíbrio entre sinais pró-inflamatórios e imunossupressores no contexto tumoral, influenciando a progressão da doença e a eficácia de terapias imunomodulatórias (ALLARD et al., 2020). Ainda, análises pré-clínicas demonstraram que direcionar a via geradora de Ado (CD73) ou receptores adenosinérgicos (A2A) alivia a imunossupressão e inibe fortemente o crescimento do tumor. Nesse viés, no microambiente tumoral, a Ado suprime a imunidade antitumoral, essencialmente através dos receptores de Ado, A2A e A2B (BUISSERET et al., 2017).

Além disso, o microambiente tumoral é caracterizado por um intenso estresse oxidativo (EO), resultante do desequilíbrio entre EROs e os sistemas antioxidantes endógenos. A produção de EROs além de ser gerada pelo SP, também pode ser ocasionada por fatores externos, como o tabagismo, destacado como um dos principais causadores de CaB, assim como pela ação do tumor no microambiente tumoral. O perfil redox, no caso das neoplasias é caracterizado por um aumento dos marcadores oxidantes e a redução das defesas antioxidantes, essa desregulação é chamada de EO e ocasiona diversas repercussão entre elas o surgimento e progressão do câncer (LIU et al., 2021). Marcadores como o malondialdeído (MDA) e os tióis proteicos refletem, respectivamente, o grau de peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante tecidual (STADTMAN; LEVINE, 2003). Componentes como a vitamina C (ácido ascórbico) também atuam como elementos de defesa frente à agressão oxidativa, podendo estar alterados em diferentes estágios do câncer (VERMA et al., 2021; LUO et al., 2018).

Considerando esse cenário, a investigação conjunta dos componentes da via purinérgica e do EO pode fornecer subsídios importantes para compreender os mecanismos de progressão tumoral e identificar potenciais biomarcadores em pacientes com CaB. Neste estudo, analisamos a expressão gênica de CD39, CD73 e A2A, os níveis de ATP extracelular, MDA, ROS, vitamina C, tióis e a expressão proteica de CD39, buscando integrar essas variáveis à caracterização molecular e bioquímica da doença.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de componentes do sistema purinérgico no microambiente tumoral de indivíduos com neoplasia de bexiga, além de avaliar o perfil redox no ambiente sistêmico destes indivíduos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização da amostra estudada;
- Analisar a quantidade de ATPe no ambiente sistêmico de indivíduos com CaB em comparação com o grupo controle;
- Avaliar a expressão gênica das ectoenzimas CD39 e CD73 e do receptor A2A no microambiente tumoral e no tecido saudável;
- Analisar a expressão proteica da ectoenzima CD39 no ambiente sistêmico de indivíduos com CaB em comparação a indivíduos saudáveis.
- Correlacionar os dados de ATPe e expressão proteica de CD39.
- Avaliar o perfil redox através das análises de Vitamina C, MPO, MDA, Tióis proteicos e não proteicos, ROS.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O CÂNCER DE BEXIGA

A bexiga urinária é um órgão do corpo humano localizado na região pélvica. Sua principal função está relacionada ao sistema urinário, no qual a urina chega pelos ureteres e é armazenada até o momento da micção. Histologicamente, ela apresenta quatro camadas distintas no sentido do interior para o exterior: epitélio de transição ou urotélio, camada de tecido conjuntivo (lâmina própria), tecido muscular e tecido conjuntivo adiposo (SHERIF, 2020).

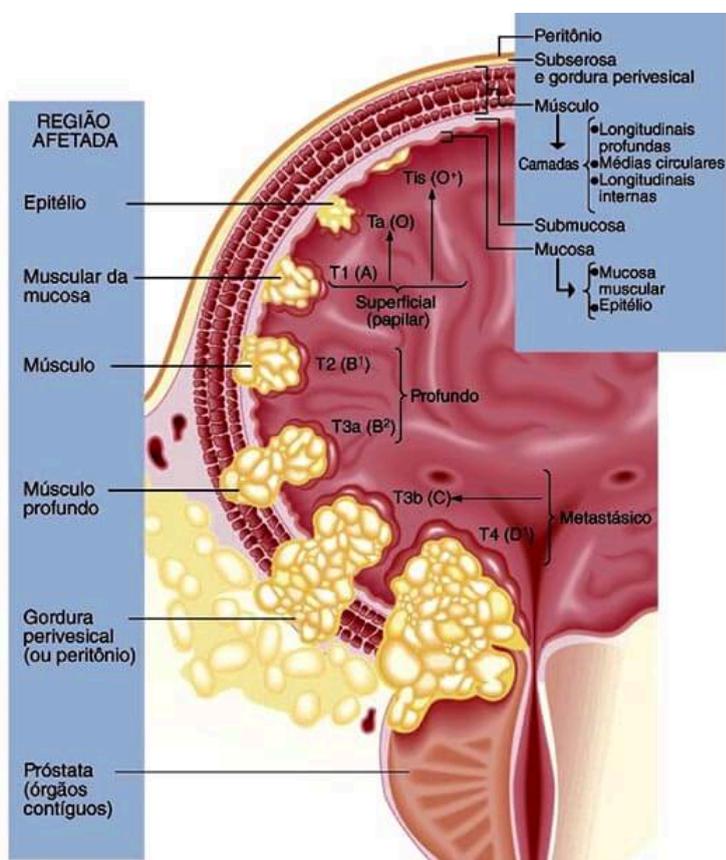
O CaB origina-se do epitélio transicional estratificado normal da bexiga e está ligado principalmente ao estilo de vida e fatores genéticos. O principal fator preditor da doença é o tabagismo, que aumenta em três vezes o risco de desenvolver a patologia, destaca-se que os fumantes passivos também fazem parte do grupo de risco. A exposição a agentes químicos como compostos petrolíferos, tintas e derivados também estão no rol de preditores da doença. Os fatores genéticos, assim como em demais neoplasias, também está associado ao surgimento de CaB, estatisticamente ter parentesco de primeiro grau com pessoas que tiveram o diagnóstico de CaB aumenta em duas vezes a probabilidade do desenvolvimento da doença. Assim, compreende-se que esses fatores colaboram para a promoção de danos no DNA favorecendo o surgimento da doença, além de atuarem como agentes de manutenção da inflamação elevada encontrada no microambiente tumoral (DOBRUCH; OSZCZUDLOWSKI, 2021).

O estadiamento do CaB está intrinsecamente ligado à forma como a doença pode surgir e progredir, sendo classicamente dividido em câncer de bexiga não músculo-invasivo (NMI), que representa cerca de 80% dos casos, e câncer de bexiga músculo-invasivo (MI), correspondendo aos 20% restantes. Para um diagnóstico e planejamento terapêutico mais precisos, essas categorias são subdivididas usando o sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástase), uma ferramenta padronizada internacionalmente que descreve a extensão anatômica do câncer. No sistema TNM, T refere-se ao tamanho e à extensão do tumor primário na bexiga; N indica se o câncer se espalhou para os linfonodos regionais (próximos à bexiga); e M determina se o câncer se disseminou para outras partes do corpo (metástase à distância). No caso do CaB NMI, os tumores são caracterizados por permanecerem nas camadas mais superficiais da bexiga, começando como carcinoma in situ (Tis) e podendo se estender até a lâmina própria através dos estágios Ta e T1. Já o CaB MI é mais agressivo e se

caracteriza pelo comprometimento da camada muscular do órgão, com estágios que podem variar do T2a ao T4. No último estágio (T4), todas as camadas da bexiga foram afetadas, e as células cancerígenas possuem um alto potencial metastático (DeGEORGE; HOLT; HODGES, 2017). Essa distinção no estadiamento é crucial para determinar o prognóstico e guiar as decisões de tratamento (Figura 1) (Quadro 1).

A fim de combater o avanço da neoplasia, algumas formas de tratamento são mais utilizadas, levando em consideração o estadiamento da doença. As ações relacionadas ao NMI incluem a quimioterapia intravesical, vantajosa pelo fato de afetar apenas a área necessária, contudo ainda há a preocupação de fazer com que a permanência dos agentes seja maior, uma das estratégias utilizadas é o uso de hidrogéis. A imunoterapia com a aplicação intravesical de BCG (Bacillus Calmette-Guérin) é utilizada como terapia adjuvante depois da ressecção, com o objetivo de impulsionar a resposta imune no local (HAN et al., 2020). Se tratando do MI, as principais técnicas utilizadas são a quimioterapia neoadjuvante à base de platina seguida de cistectomia radical (PATEL; OH; GALSKY, 2020). Nota-se, portanto, que o tratamento do CaB possui repercussões sistêmicas e eficácia limitada, sendo marcadores do SP e do EO são possíveis alvos terapêuticos para o aperfeiçoamento dos tratamentos atuais.

Figura 1 - Estadiamento clínico associado ao TNM no câncer de bexiga



Fonte: ROSA (2016).

Quadro 1 - Classificação TNM do Câncer de Bexiga

Categoria	Critério
T	Tumor primário
TX	Tumor não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilífero não invasivo
Tis	Carcinoma in situ, sem invasão de lâmina própria e de baixo grau
T1	Tumor que invade a lâmina própria
T1a	Tumor invade mucosa
T1b	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade musculatura própria
pT2a	Tumor invade musculatura superficial interna
pT2b	Tumor invade musculatura profunda/externa
T3	Tumor invade tecidos adjacentes
pT3a	Microscopicamente
pT3b	Macroscopicamente
T4	Tumor que invade as seguintes estruturas: estroma prostático, vesículas seminais, útero, vagina, parede pélvica ou abdominal
pT4a	Tumor que invade: estroma prostático, vesículas seminais, útero, vagina
pT4b	Tumor que invade parede pélvica ou abdominal
N	Linfonodos regionais
NX	Linfonodos não podem ser avaliados
N0	Sem metástase linfonodal
N1	Metástase de linfonodo regional única na pelve verdadeira
N2	Metástases linfonodais regionais múltiplas na pelve verdadeira
N3	Metástase em linfonodos ilíacos comuns
M	Metástase à distância
M0	Sem metástase a distância
M1	Metástase distante

M1a	Metástase distante limitada aos gânglios linfáticos
M1b	Metástase distante não linfonodal

Fonte: Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition (2017) publicado por Springer International Publishing. Corrected at 4th printing (2018).

3.2 O SISTEMA PURINÉRGICO E O CÂNCER DE BEXIGA

O SP é um sistema capaz de regular as respostas do sistema imunológico. É composto por diversas moléculas e receptores. Destaca-se os nucleotídeos ATP, adenosina di-fosfato (ADP), adenosina mono-fosfato (AMP) e a Ado, essas moléculas são hidrolisadas por enzimas. A enzima NTPDase-1 (CD39) é responsável por hidrolisar ATP em ADP e este a AMP, a CD73 hidrolisa AMP em Ado, enquanto a Adenosina Deaminase (ADA) realiza a hidrólise de Ado em hipoxantina e inosina. Ainda, o SP conta com duas famílias de receptores, os P2 e os P1. Os receptores P2 são divididos em P2X, composto por sete receptores (1-7) e os P2Y2 (1, 2, 4, 6, 11-14) ambos com afinidade pelo ATP e ADP. Os P1 contam com quatro receptores (A1, A2A, A2B e A3) e são ligados a Ado (ROCKENBACH et al., 2014).

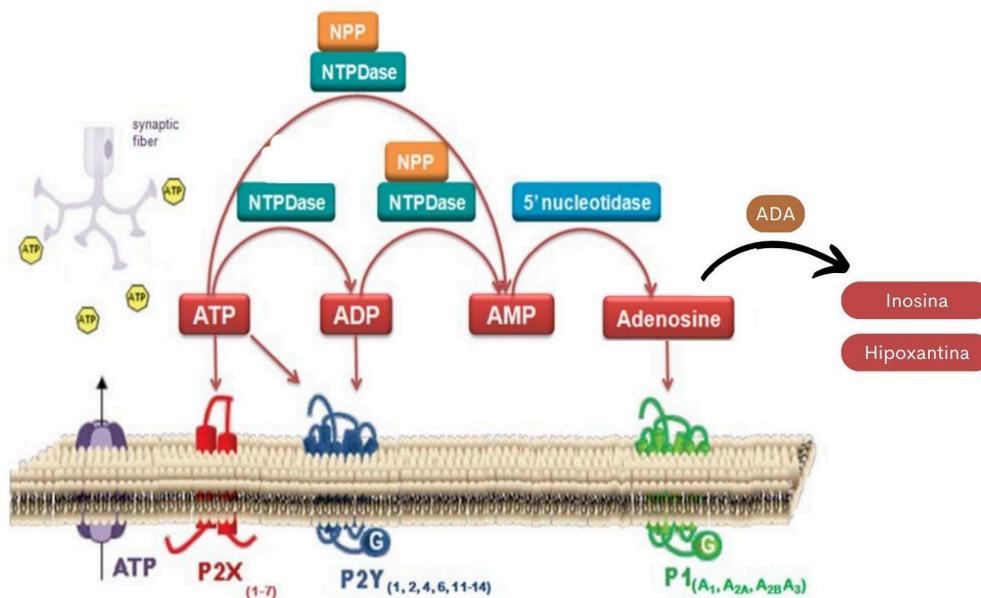
Demonstra-se que o ATP e a Ado estão diretamente associadas à imunologia tumoral. O MAT é considerado um ambiente inflamatório e isso afeta a progressão tumoral, além disso, sabidamente é rico em ATP extracelular, entretanto seu papel não é muito conhecido. Por outro lado, a Ado tem forte ligação com a imunossupressão, também encontra-se aumentada no MAT e demonstrou-se que interferindo na geração ou nos receptores de Ado a imunossupressão é revertida (DI VIRGILIO et al., 2016).

A respeito da participação dos componentes purinérgicos no CaB, estudos mostraram que um aumento na expressão de receptores P2X é um indicativo de agravamento do prognóstico (LEDDERROSE et al., 2023), como também o receptor A2B, que ao ser inibido impediu a proliferação da neoplasia (ZHOU et al., 2017). Além disso, há diferentes graus de expressão desses elementos dependendo do tecido atingido (SVENNERSTEN et al., 2015).

Ademais, o papel das ectonucleotidases é de grande importância já que são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Dentre elas, está a CD73, estudada como possível alvo para imunoterapias. Ela é responsável pela geração de Ado através da hidrólise de AMP e está em maior quantidade em tecidos com crescimento tumoral, logo, acredita-se que um tratamento a inibindo possa ser de grande valia para retardar o avanço da neoplasia (ALLARD et al., 2017). A família das NTPDases também é pesquisada por serem

responsáveis pela hidrólise de ATP em ADP, e de ADP em AMP (Figura 2), o que pode corroborar com o avanço do tumor (DA SILVA et al., 2023).

Figura 2- Componentes do Sistema Purinérgico



Fonte: Adaptado de Ornelas (2013).

3.3 IMPLICAÇÕES DO ESTRESSE OXIDATIVO NO CÂNCER DE BEXIGA

A desregulação entre os agentes oxidantes e as defesas antioxidantes ocasiona um estado chamado de EO, o qual é impulsionado pela produção de EROs (Figura 3) (SUL; RA, 2021). Esse estado é responsável por inúmeras repercussões e está intimamente ligado com a inflamação e a carcinogênese em diversas neoplasias, inclusive o CaB (LIU et al., 2021).

O estudo de Mendes e colaboradores concluiu que indivíduos com CaB possuem níveis elevados de EROs e também redução dos níveis de antioxidantes, dessa forma caracterizando o quadro de EO já constatado em outros tipos de neoplasia (MENDES et al., 2021). O estudo de Jelic e colaboradores demonstrou que o EO é responsável por modificar diversos mecanismos supressores de tumor, capaz de alterar a expressão do gene p53, por exemplo. Além disso, no CaB demonstrou-se uma hipometilação do elemento nuclear 1 intercalado longo (LINE-1) causado por EROs, fator que impulsiona a tumorigênese e progressão do câncer (JELIC et al., 2021; WHONGSIRI et al., 2018). Enquanto Wigner et al. (2021) demonstrou uma correlação positiva entre os níveis de EO e a classificação do CaB,

ou seja, quanto maior o nível de EO maior o grau histológico do tumor e, portanto, mais grave é a doença (LIU et al., 2021).

Sabe-se que o MAT tem características distintas do ambiente saudável, destaca-se os níveis baixos de oxigênio que geram um ambiente hipóxico. Nesse sentido, a manutenção desse aspecto do ambiente se dá pela sustentada produção de EROs devido a alta taxa metabólica tumoral (DUGBARTEY et al., 2024). O estudo de Liang e colaboradores demonstrou que a expressão do fator 1α induzível por hipóxia (HIF- 1α) é induzida pela elevação das EROs promovendo a glicólise e a adaptação das células neoplásicas no MAT (LIANG et al., 2022). Tendo em vista a importância e repercussão da hipóxia na carcinogênese, Liu e colaboradores criaram e validaram uma escala de risco de hipóxia no CaB, segundo o estudo esse fator relaciona-se diretamente com a inflamação e com a sensibilidade da neoplasia aos tratamentos quimioterápicos e imunoterápicos (LIU et al., 2021).

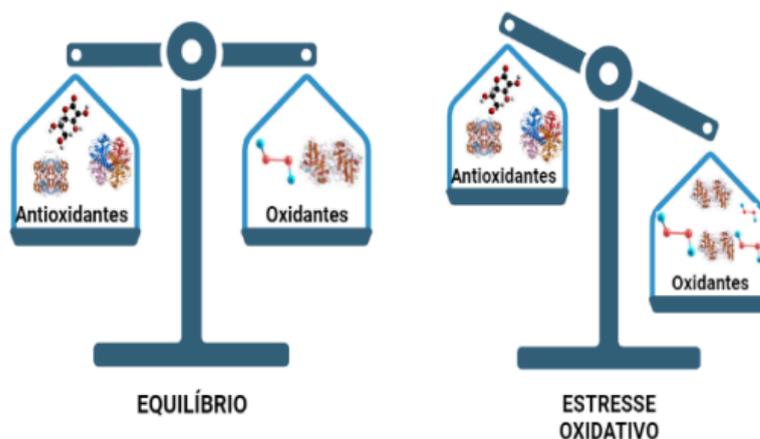
Como discutido por Mendes e colaboradores, nota-se que as defesas antioxidantes estão reduzidas em diversos tipos de neoplasia. Os níveis reduzidos de superóxido dismutase (SOD), por exemplo, foram ligados a um estágio mais avançado de CaB (MENDES et al., 2021; GUPTA et al., 2012). Além disso, em um estudo com câncer de mama demonstrou-se que bloqueando a ação das enzimas antioxidantes houve um aumento das EROs (COBBS et al., 2012). Outro estudo com tumores de sistema nervoso central demonstrou uma maior expressão da enzima que elimina os íons superóxidos Mn-SOD em tecido tumoral, sendo diretamente ligada ao grau do tumor, tecidos saudáveis praticamente não expressam enquanto tumores de alto grau expressam uma maior quantidade (ZHANG; LI, 2021).

Sabe-se que além das enzimas antioxidantes como a SOD e catalase (CAT), o organismo é capaz de produzir compostos capazes de atuar como agentes antioxidantes. Os compostos contendo sulfidril (SH), chamados de tióis, podem facilmente perder um elétron a fim de estabilizar um radical livre. Os tióis não proteicos, estão ligados a proteção do processo de iniciação tumoral, nos animais o mais abundante é a Glutathiona Reduzida (GSH), o aumento nos níveis de concentração desta molécula em pacientes com câncer está ligado a resistência deste tumor a quimioterapia (ZANINI, 2014; ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006).

A vitamina C ou ácido ascórbico é um componente hidrossolúvel, encontrado em vegetais e frutos e com papel fundamental da oxi-redução das células, transportando moléculas de hidrogênio ou capturando moléculas isoladas de oxigênio (O_2). Nesse sentido,

acaba sendo utilizada amplamente como coadjuvante nas terapias anticâncer (ALMEIDA, 2008).

Figura 3- Estresse oxidativo



Fonte: Puhle (2022).

3.4 RELAÇÃO DO SP COM O EO NO CÂNCER DE BEXIGA

A carcinogênese da bexiga está associada a um MAT complexo, marcado por inflamação crônica, hipóxia e desregulação imunológica, condições que favorecem tanto o aumento do EO quanto a ativação da sinalização purinérgica (DI VIRGILIO et al., 2020).

O SP é composto por receptores e enzimas que modulam os níveis extracelulares de nucleotídeos como o ATP e Ado. Em tumores, a liberação descontrolada de ATP extracelular atua como um DAMP, estimulando vias pró-inflamatórias e o recrutamento de células imunes (STAGG; SMITH, 2008). Esse ATP é hidrolisado pelas enzimas ectonucleotidases CD39 e CD73, gerando Ado, que atua como moduladora imunossupressora via receptores como o A2A (ALLEN et al., 2022).

Simultaneamente, o EO contribui para danos celulares, proliferação descontrolada e evasão da apoptose (JAIN et al., 2017). Estudos demonstram que altos níveis de EROs podem inibir a expressão ou a atividade de CD39 e CD73, favorecendo o acúmulo de ATP e perpetuando a inflamação local (PETRUK et al., 2019).

No CaB, evidências apontam para um padrão compartimentalizado: redução de CD39 no MAT, contribuindo para inflamação local, acompanhada por aumento de CD39 sistêmico, possivelmente como mecanismo compensatório (ROSSETTO et al., 2024). Além disso, o

aumento de MDA e a depleção de antioxidantes como tióis reforçam a presença de EO, que pode estar envolvido tanto na modulação da expressão gênica de componentes purinérgicos quanto na promoção da progressão tumoral.

Essa interconexão sugere que o SP e o EO não atuam de forma isolada, mas sim de maneira sinérgica, moldando o comportamento do tumor, a resposta imune e a resistência terapêutica. Assim, ambos representam potenciais alvos para estratégias terapêuticas combinadas no CaB.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho está vinculado ao Projeto “Guarda-Chuva” intitulado “Biorrepositório de biópsias tumorais para avaliação da expressão gênica e proteica dos receptores e enzimas do sistema purinérgico em ênfase em tumores de mama, próstata e colorretal”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da UFFS sob o protocolo número 87508918.4.0000.5564. O presente estudo é caracterizado como quantitativo observacional transversal. O material biológico foi coletado no período de agosto de 2022 a dezembro de 2023, no qual se procedeu a avaliação da expressão gênica de componentes do sistema purinérgico (CD39, CD73 e A2A), expressão proteica da ectonucleotidase CD39, quantificação do ATP extracelular, análise do perfil redox (VIT C, MPO, Tióis proteicos e não proteicos e EROs) de 45 pacientes com CaB, recém diagnosticados com a doença, anteriormente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico, destes indivíduos, além de sangue periférico, foram coletadas amostras de tecido tumoral e saudável da bexiga durante o ato cirúrgico pela equipe responsável. O grupo controle foi composto por 46 indivíduos, com idade e sexo pareada à do grupo investigado e que não tenham recebido diagnóstico de neoplasia em qualquer sítio anteriormente. 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 participantes foram, então, convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O sangue venoso coletado foi utilizado para obtenção dos linfócitos e separação de soro e plasma e o tecido (tumoral e não tumoral) foi armazenado em RNA later. As análises bioquímicas e moleculares foram realizadas nos laboratórios de pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - *Campus* Chapecó (SC). As informações de prontuário médico foram obtidas nas pastas dos pacientes arquivadas no HRO, e foram utilizadas para complementar as análises biológicas.

4.2 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES

A amostra foi composta por 45 indivíduos que seriam submetidos a cirurgia de ressecção tumoral, e que não haviam iniciado o tratamento cirúrgico e/ou farmacológico anteriormente, além disso os participantes não poderiam ter histórico anterior de câncer em qualquer sítio. Estes foram selecionados por amostragem não probabilística de acordo com o pesquisador que estava realizando a coleta, assim serão do tipo por conveniência onde são selecionados os membros participantes mais acessíveis no momento. Foi realizado o cálculo amostral, através de dados públicos disponíveis no Datasus, aplicando-se os seguintes filtros: Região de Tratamento (Sul), Município de Tratamento (Chapecó), Ano do diagnóstico (2022) Diagnóstico detalhado (C67- Neoplasia maligna de bexiga); Modalidade Terapêutica (Cirurgia), o n calculado foi de 16 participantes, tendo uma confiabilidade de 95%.

4.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos procedentes do oeste de SC, diagnosticados por médico especialista, com neoplasia de bexiga, maiores de 18 anos de idade, que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para retirada do tumor, e que não tenham sido submetidos a nenhum tipo de terapia neoadjuvante (quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia, terapia de precisão). O grupo controle, foi composto por indivíduos maiores de 18 anos, sem histórico de neoplasia em qualquer sítio.

4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.5.1 Coleta e processamento das amostras biológicas

Foi realizada coleta de sangue (30 mL), por punção venosa, de ambos os grupos, seguindo os critérios de inclusão e exclusão. O sangue foi coletado em tubos vacutainer contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante para a separação do plasma e dos linfócitos, e em tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro. Os indivíduos controle foram selecionados em outros ambientes de saúde no município de Chapecó/SC, com base em pareamento por idade (+/- 5 anos) e gênero em relação aos pacientes. O procedimento para coleta de sangue e tecido foi o mesmo realizado nos pacientes e somente foi conduzido após assinatura do TCLE. A coleta de tecido tumoral (fragmento de tecido identificado como peça tumoral) e não tumoral (tecido saudável da bexiga do mesmo indivíduo) foi realizada pelo médico cirurgião, durante o procedimento cirúrgico (que já fazia parte do tratamento do paciente), após a ressecção do tumor um

fragmento do tecido era retirado para a pesquisa e o restante era encaminhado a patologia para biópsia, o tecido não tumoral era um fragmento do tecido saudável da bexiga (do mesmo indivíduo), retirado no mesmo procedimento. Após a fragmentação, as peças foram armazenadas em microtubos contendo solução inibidora de RNAses (RNA*later*) e encaminhadas aos laboratórios da UFFS, onde foram congeladas a -20°C e posteriormente transferidas ao freezer a -80°C. As análises bioquímicas foram realizadas nos laboratórios de pesquisa biológica da UFFS - Campus Chapecó/SC.

4.5.2 Processamento do sangue periférico

Após coleta os tubos contendo EDTA e os contendo gel ativador e separador de coágulo foram centrifugados a 3.000RPM por 15 minutos, a 4°C, para a obtenção do plasma e do soro respectivamente. Os tubos de citrato de sódio a 3,2% foram usados para obtenção do sangue total. Posterior a isso todos os produtos (plasma, soro e sangue total) foram distribuídos em tubos eppendorfs® de polipropileno de 1,5mL, identificados e separados em alíquotas para cada análise e conservados a -80°C para posteriores análises.

Para o isolamento de linfócitos, as amostras de sangue coletadas 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 µL de solução salina. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até a realização dos experimentos (Leal, 2005).

4.5.3 Expressão gênica por RT-qPCR

A expressão dos genes alvo (CD39, CD73 e A2A) e de referência (actina B - ACTB) nos tumores e no tecido não tumoral da bexiga, foi avaliada por RT-qPCR. A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante (Ambion by Life Technologies). O RNA isolado foi tratado com a enzima DNase (Thermo Fisher Scientific), e as concentrações e pureza dos RNAs foram determinadas utilizando o espectrofotômetro "Nanodrop One®" (Thermo Scientific). A retrotranscrição de até 2 µg de RNA para síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente, foram preparadas soluções de cDNA a 10 ng/ul. As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento QuantStudio 7 Pro Real-Time PCR Systems, com protocolo "Sybr Green" (Applied Biosystems). A análise da expressão gênica foi realizada por Quantificação Relativa (DDCt). A análise das curvas de amplificação são feitas no Design & Analysis Real-Time PCR System, em um volume de reação de 10 µl, foram adicionados 3 µl de cDNA modelo (10 ng/µ), 0,5 µl de primers forward e reverse (10 uM), 1 µl de água (H₂O) e 5 µl de "Sybr Green" (Applied Biosystems). O programa de PCR utilizado foi: dois minutos a 50 °C, dois minutos a 95 °C (desnaturação inicial), 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e um minuto na temperatura de anelamento a 60 °C, seguido por protocolo padrão de temperaturas para a análise de *melting*. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.5.3 Expressão proteica por citometria de fluxo

Para avaliação da expressão da ectonucleotidase CD39 utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-humano conjugado com o fluoróforo CD39-PE (Clone TU66, catálogo 555465, BD Bioscience). A técnica de marcação utilizou 100 µL de células mononucleares do sangue periférico/linfócitos extraídos conforme técnica descrita e 5 µL de anticorpo conforme protocolo do fabricante, as amostras foram incubadas por 30 minutos e posteriormente lavadas com solução salina para realização da leitura. Após a marcação, as células foram capturadas (10.000 eventos) usando citômetro de fluxo BD *Accuri™ C6 Plus* (San Diego, CA, EUA). Os dados foram obtidos pela leitura dos eventos avaliando os parâmetros de tamanho da célula (FSC, do inglês Forward Scatter), granulosidade (SSC, do inglês Side Scatter) e intensidade de fluorescência no respectivo canal de leitura, e posteriormente comparados com um controle não marcado. Ao final, os resultados foram expressos em percentual de células marcadas em relação ao controle e analisados estatisticamente para obtenção da expressão da ectonucleotidase.

4.5.4 Perfil Redox

4.5.4.1 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A atividade plasmática da enzima MPO pró-oxidante e pró-inflamatória foi medida espectrofotometricamente de acordo com o protocolo anterior (JENTZSCH et al, 1996), foram utilizadas amostras de plasma, em triplicatas. O produto gerado é um cromóforo rosa lido espectrofotometricamente a 492 nm. No ensaio foram utilizados 3'-dimetoxibenzidina (DMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como substratos. Os resultados foram expressos como μM de quinoneimina produzida em 30 min ($\mu\text{Mq}/30 \text{ min}$).

4.5.4.2 Detecção de EROs

A formação de EROs foi estimada pelo protocolo fluorimétrico estabelecido por Ali e colegas, em triplicatas (ALI; LEBEL; BONDY, 1992). O soro foi incubado durante 30 min a 37 ° C com diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), e o produto de oxidação final de DCFH-DA, diclorofluoresceína (DCF), foi medido. A intensidade da emissão de fluorescência foi lida na emissão de 525 nm e na excitação de 488 nm (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX).

4.5.4.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi avaliada pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o MDA (SUZUKI et al., 1983). A amostra utilizada foi o plasma, em triplicatas. O produto gerado é um cromóforo rosa lido espectrofotometricamente a 532 nm (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX). Os resultados foram expressos em nmol MDA/L.

4.5.4.4 Níveis de tiol total (PSH) e tiol não proteico (NPSH)

A quantificação dos grupos tiol, biomarcador clássico do EO, ocorreu conforme proposto anteriormente, com adaptações, em amostra de plasma e triplicatas, utilizando tampão fosfato de potássio 1 M (KPF) em pH 7,4 e ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (ELLMAN, 1959). O procedimento foi realizado em banho de gelo e as leituras

foram feitas em espectrofotômetro visível a 412 nm (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX). Os resultados foram medidos como $\mu\text{mol NPSH/mL}$ de soro e $\mu\text{mol PSH/mL}$ de soro.

4.5.4.5 Teor de VIT C (ácido ascórbico)

A quantificação dos níveis de VIT C foi realizada, através de amostras de soro, em triplicatas, usando um método descrito anteriormente (GALLEY et al, 1997). O método identifica a geração de um cromógeno laranja produzido pela reação da VIT C com dinitrofenilhidrazina (DNPH) a 37 °C, medida espectrofotometricamente a 520 nm (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX). Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/mL de soro.

4.5.5 Determinação de ATP

A quantificação do ATP extracelular foi realizada utilizando o kit ATP Determination (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. O material biológico utilizado foi soro. Além disso, a análise fotométrica foi realizada utilizando leitor de microplacas Varioskan (ThermoScientific®), medida espectrofotometricamente a 560 nm. Os resultados foram expressos em nM.

4.5.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0. Os outliers foram previamente removidos e a análise da distribuição dos dados foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk. A distribuição dos dados não seguiu a curva Gaussiana, então foram aplicados testes não paramétricos. O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparações de dados entre dois grupos (CaB e controles). Para as análises pareadas utilizou-se do teste de Wilcoxon. As análises de correlação foram realizadas através dos testes de Correlação de Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram apresentados como mediana, intervalo de confiança de 95% e tamanho amostral (n).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Tabela 1- Características epidemiológicas e histológicas do grupo CaB

Característica	Grupo CaB (n=45)
Idade:	
Média ± desvio padrão	71 ± 8,73 anos
Sexo [n (%)]:	
Masculino	33 (73,3%)
Feminino	12 (26,6%)
Tabagismo [n (%)]:	
Sim	30 (66,6%)
Não	15 (33,3%)
História de câncer na família (1º grau)	
Sim	16 (35,5%)
Não	19 (42,2%)
Sem informações em prontuário	10 (22,2%)
Tipo histológico [n (%)]:	
Carcinoma urotelial	43 (95,5%)
Carcinoma de células escamosas	1 (2,2%)
Sem informações em prontuário	1 (2,2%)
Grau de diferenciação celular n (%):	
Alto grau	20 (44,4%)
Baixo grau	23 (51,1%)
Sem informações em prontuário	2 (4,4%)
Invasibilidade n [n (%)]:	
Invasivo (MI)	21 (46,6%)
Não invasivo (NMI)	20 (44,4%)
Sem informações em prontuário	4 (8,8%)

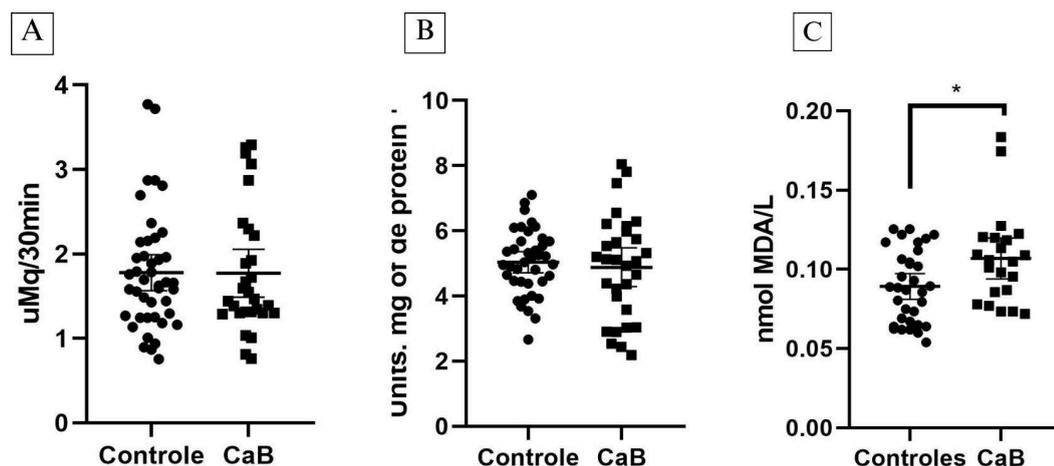
O grupo controle foi pareado por idade e sexo com o grupo CaB, sendo 37 (80%) participantes do sexo masculino e 9 (20%) participantes do sexo feminino. A média de idade foi de 68 anos com desvio padrão de $\pm 9,16$ anos. Não houve diferença estatística na idade entre os grupos ($p=0,7910$).

5.2 PERFIL REDOX

5.2.1 Pacientes com CaB demonstraram níveis aumentados de MDA

Nota-se o aumento do perfil oxidativo através da análise de TBARS (Figura 6), onde os níveis de MDA foram mais altos no grupo CaB em relação ao grupo controle ($p=0,0319$).

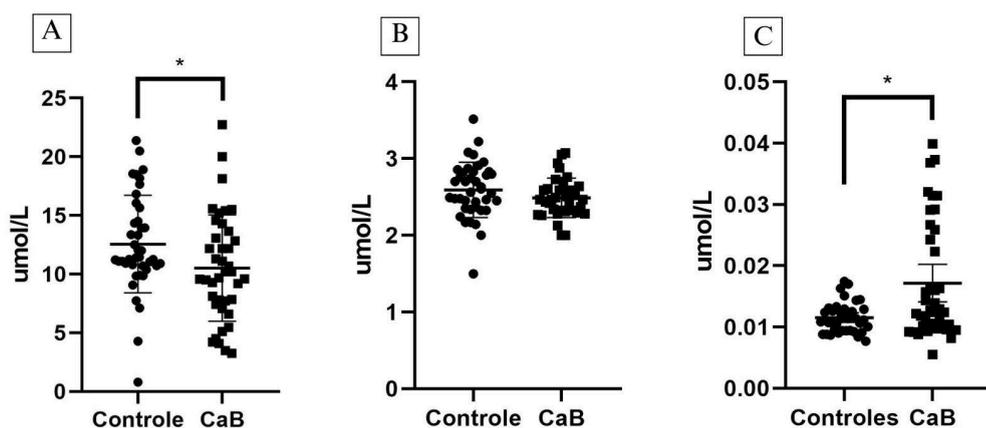
Figura 6- Marcadores oxidativos



Marcadores oxidantes. **A.** Os níveis de MPO não mostraram diferença no grupo CaB (1,789 uMq/30min; 1,316 a 1,925 uMq/30min; $n=28$) em comparação aos controles (1,788 uMq/30min; 1,442 a 1,932 uMq/30min; $n=43$); valor de $p=0,9232$. **B.** Os níveis de EROs não mostraram diferença no grupo CaB (4,94 U DCFH/mg proteína; 4,21 a 4,74 U DCFH/mg proteína; $n=29$) em comparação aos controles (5,03 U DCFH/mg proteína; 4,62 a 5,43 U DCFH/mg proteína; $n=39$); valor de $p=0,6235$. **C.** Os níveis de MDA mostraram-se maiores no grupo CaB (0,1078 nmol MDA/L; 0,085 a 0,12 nmol MDA/L; $n=21$) comparado ao grupo controle (0,0885 nmol MDA/L; 0,735 a 0,103 nmol MDA/L; $n=33$); valor de $p=0,0253$. Os dados foram apresentados como mediana e IC95%.

5.2.2 O grupo CaB apresenta redução dos níveis de PSH

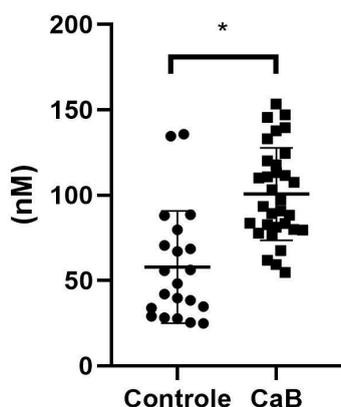
Evidenciou-se a redução de PSH no grupo CaB em comparação ao grupo controle ($p=0,0372$). Em contrapartida, os níveis de Vitamina C foram maiores no grupo CaB ($p=0,0293$).

Figura 7- Marcadores antioxidantes

Marcadores antioxidantes. **A.** Os níveis de PSH foram reduzidos no grupo CaB (10,52 $\mu\text{mol/L}$; 7,84 a 12,19 $\mu\text{mol/L}$; $n=39$) em comparação aos controles (12,56 $\mu\text{mol/L}$; 10,92 a 13,94 $\mu\text{mol/L}$; $n=41$); valor de $p=0,0404$. **B.** Os níveis de NPSH não mostraram diferença no grupo CaB (2,47 $\mu\text{mol/L}$; 2,32 a 2,59 $\mu\text{mol/L}$; $n=34$) em comparação aos controles (2,59 $\mu\text{mol/L}$; 2,45 a 2,75 $\mu\text{mol/L}$; $n=40$); valor de $p=0,1043$. **C.** O nível de ácido ascórbico foi aumentado no grupo CaB (0,012 $\mu\text{mol/L}$; 0,01 a 0,016 $\mu\text{mol/L}$; $n=40$) em comparação aos controles (0,011 $\mu\text{mol/L}$; 0,01 a 0,012 $\mu\text{mol/L}$; $n=40$); valor de $p=0,0293$. Os dados foram apresentados como mediana e IC95%.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE ATP

A Figura 4 mostra a análise da determinação de ATP extracelular no soro. O grupo CaB apresentou maior concentração de ATP extracelular quando comparado ao grupo controle ($p<0,0001$).

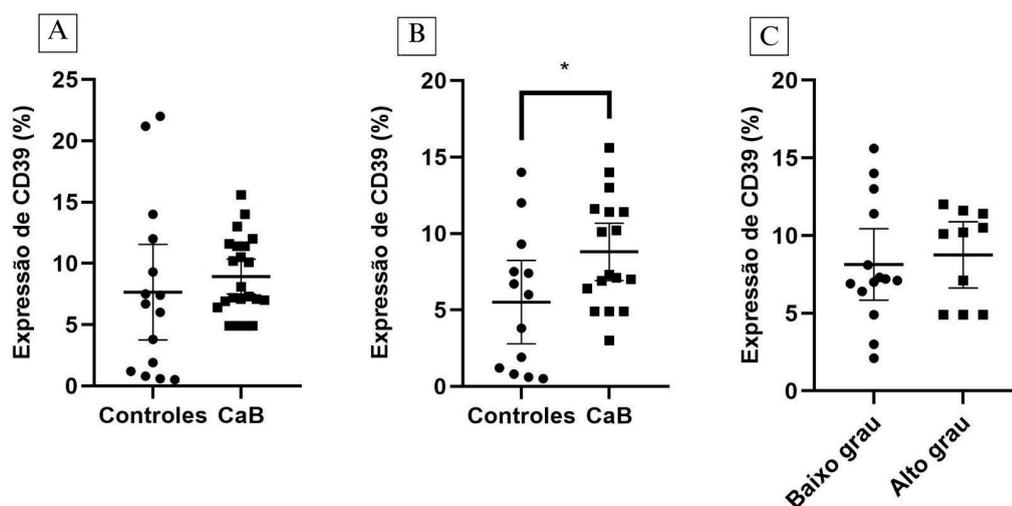
Figura 4 - ATP extracelular

A quantificação de ATP foi maior no grupo CaB (100,69 nM; 54,7 a 153,4 nM; $n=32$) em comparação aos controles (57,96 nM; 24,9 a 135,7 nM; $n=21$); valor $p<0,0001$. Os dados foram apresentados como mediana e IC95%.

5.4 EXPRESSÃO PROTEICA DE CD39

Não houve diferença significativa entre os grupos na análise de expressão proteica de CD39 (Figura 5). Porém, ao analisar somente os indivíduos com CaB do grupo NMI, houve uma maior expressão de CD39 neste grupo em comparação ao grupo controle ($p=0,0353$).

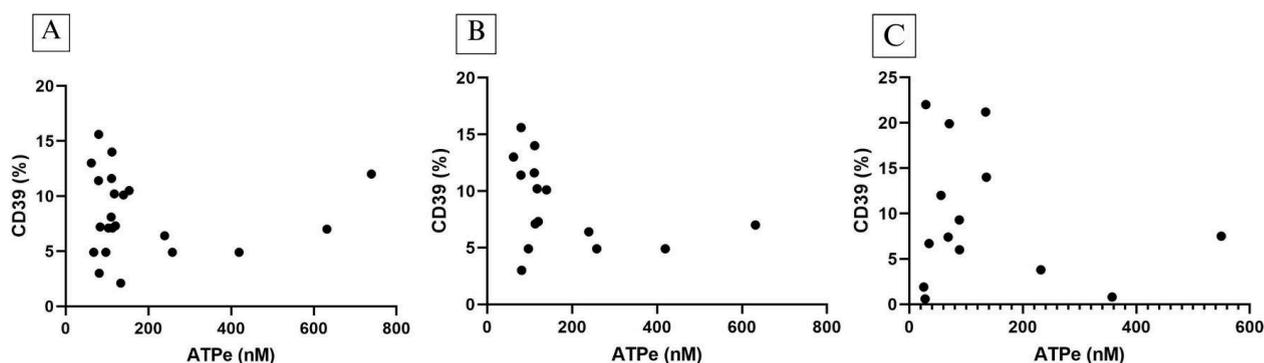
Figura 5- Expressão de CD39



Expressão proteica de CD39 em linfócitos. **A.** Não houve diferença entre os grupos CaB (7,7%; 6,9 a 11,4; n= 22) em comparação aos controles (6,7%; 1,2 a 12%; n= 15); valor $p= 0,2335$. **B.** Aumento da expressão de CD39 no grupo CaB com característica NMI (8,8%; 6,4 a 11,4 %; n= 17) em relação ao grupo controle (5,5%; 0,8 a 9,3%; n= 13); valor $p= 0,0353$. **C.** Não houve diferença na expressão de CD39 quando comparado o grupo CaB de baixo grau (10,15%; 2,1 a 15,6; n= 10) com o grupo CaB de alto grau (7,15%; 4,9 a 12; n= 14); valor de $p=0,7189$. Os dados foram apresentados como mediana e IC95%.

5.5 NÃO HOUE CORRELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE ATPe E A EXPRESSÃO DE CD39

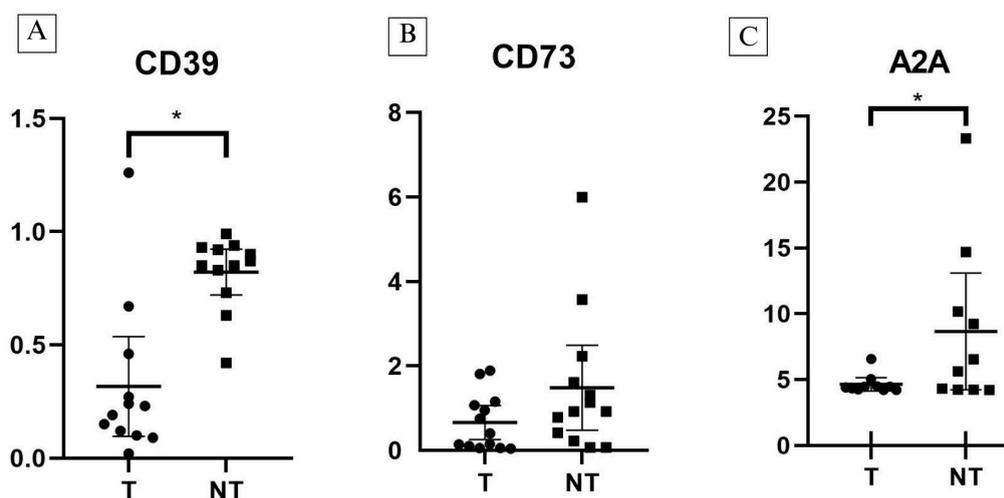
Não foi possível observar relação entre a quantidade de ATPe e a expressão proteica de CD39 em nenhum dos grupos estudados (Figura 8).

Figura 8- Correlação entre ATPe e CD39

Correlação. **A.** Não houve correlação entre a quantidade de ATPe e a expressão de CD39 segundo o teste de Pearson ($p=0,9113$; $n=22$). **B.** Não houve correlação entre a quantidade de ATPe e a expressão de CD39 em indivíduos com CaB com característica não músculo invasivo segundo o teste de Pearson ($p=0,1555$; $n=15$). **C.** Não houve correlação entre a quantidade de ATPe a expressão de CD39 no grupo controle segundo o teste de Pearson ($p=0,4544$; $n=14$).

5.6 PACIENTES COM CaB APRESENTAM REDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CD39 E A2A NO MAT

Observou-se uma redução da expressão gênica de componentes purinérgicos no MAT em relação ao tecido não tumoral da bexiga dos mesmos pacientes (Figura 9).

Figura 9- Expressão gênica no microambiente tumoral

Expressão gênica. **A.** A expressão de CD39 está reduzida no tecido tumoral em comparação ao tecido não tumoral da bexiga ($n=12$); valor de $p=0,0269$. **B.** A expressão CD73 não mostrou diferença entre tecido tumoral e não tumoral da bexiga ($n=13$); valor de $p=0,2510$. **C.** A expressão de A2A foi reduzida no tecido tumoral em relação ao tecido não tumoral da bexiga ($n=10$); valor de $p=0,0273$. Os dados foram apresentados como mediana e IC95%.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos marcadores moleculares e bioquímicos relacionados à via purinérgica e ao EO em pacientes com CaB, distinguindo os fenótipos NMI e MI, comparados a indivíduos controles. Nossos achados revelam alterações distintas no MAT e sistêmico desses pacientes, sugerindo um papel ativo da sinalização purinérgica na progressão tumoral e na regulação do EO (Fig. 10).

O envelhecimento dos tecidos pós-mitóticos está associado a uma diminuição contínua da capacidade mitocondrial de produzir ATP por fosforilação oxidativa. A disfunção celular causada por proporções reduzidas de ATP/ADP é acompanhada por aumento da produção mitocondrial de EROs. Assim, a diminuição da produção de ATP e o aumento do EO predispõe substancialmente os tecidos ao desenvolvimento e/ou progressão da disfunção relacionada à idade (SCHUTT et al., 2012). Os dados encontrados neste trabalho apontam para uma média de idade do grupo CaB superior a 70 anos (Tabela 1), corroborando com os achados de Paz e colaboradores (2022), no qual cerca de 90% dos pacientes com CaB eram fumantes e com idade superior a 55 anos, com uma idade média ao diagnóstico de 73 anos.

Observamos uma redução significativa da expressão gênica de CD39 no MAT de pacientes com CaB (Figura 9). A enzima CD39 é responsável pela hidrólise de ATP e ADP extracelulares em AMP, sendo um regulador chave da sinalização purinérgica e modulador da inflamação tumoral (ALLARD et al., 2017). Sua redução pode levar ao acúmulo de ATP extracelular, como confirmado pelos nossos dados, que mostram níveis elevados de ATP extracelular no grupo CaB (Figura 4). O ATP atua como DAMP, com propriedades pró-inflamatórias e pró-tumorais, promovendo proliferação celular, angiogênese e evasão imune (DI VIRGILIO et al., 2020; ANTONIOLI et al., 2016).

As altas concentrações de ATPe já foram descritas em diversos trabalhos, e estão consolidadas no MAT e no ambiente sistêmico, os danos teciduais provocados pelo tumor elevam a concentração extracelular da molécula e desencadeiam uma série de respostas. Sabe-se que as altas concentrações possuem papel transitório, visto que a via da Ado tem dupla importância para a proliferação tumoral, enquanto a concentração extracelular de ATP promove inflamação e ativa o sistema imune, a sua degradação gera Ado, que possui uma função imunossupressora importante, nesse sentido, o bloqueio da via CD39/CD73 vem sendo estudada como possível terapia antitumoral (YEGUTKIN; BOISON, 2022).

Curiosamente, identificamos um aumento da expressão proteica de CD39 no ambiente sistêmico de pacientes com câncer NMI. Essa elevação pode refletir um mecanismo

compensatório à inflamação periférica ou uma tentativa de controle da sobrecarga de ATP circulante (YEGUTKIN, 2008). Tal achado sugere que a modulação da via purinérgica é compartimentalizada, com perfis distintos no tumor e na periferia, dependendo do estágio tumoral. Resultados semelhantes foram observados por Allard et al. (2020), que demonstraram que níveis sistêmicos de CD39 estão associados à supressão imune periférica e maior capacidade tumoral de evasão (ALLARD et al., 2020). Nesse sentido, Li et al (2019) estudou o bloqueio da CD39 como terapia antitumoral e demonstrou que a via desencadeia um eixo eATP-P2X7-inflamassoma-IL18 que reduz o número de macrófagos intratumorais, aumenta a função efetora de células T intratumorais, supera a resistência anti-PD-1.

O estudo de Ferreira et al (2021) demonstrou o potencial da expressão de CD39 como marcador prognóstico de CaB, a alta expressão foi demonstrada no grupo de pacientes com a característica NMI, dado que corrobora com os achados deste estudo, tendo em vista o aumento na expressão proteica de CD39 quando comparado os indivíduos com características NMI em relação aos controles (Figura 5). Não observou-se diferença na expressão quando comparados os indivíduos com característica de baixo e alto grau histológico do tumor.

Além disso, não observamos diferença significativa na expressão gênica de CD73 no MAT entre os grupos (tecido tumoral X tecido saudável de bexiga). CD73 atua na conversão de AMP em Ado, completando a via clássica de hidrólise de nucleotídeos extracelulares. A ausência de alteração de CD73 sugere que, ao menos no nível transcricional, a etapa final da geração de Ado no MAT pode não estar comprometida, ao contrário do que se observa com a CD39. Essa dissociação entre CD39 e CD73 já foi descrita em outros modelos tumorais, indicando que a regulação dessas enzimas pode ser independente e fortemente influenciada pelo tipo tumoral, estadiamento e localização (ALLARD; LONGHI; ROBSON; STAGG, 2017; LINDEN; CUBILLOS-ROBLEDO; CHOWDHURY, 2022). Estudos prévios demonstram que o aumento de CD39 pode ocorrer na ausência de alterações em CD73, ou ainda que a Ado possa ser produzida por vias alternativas, como através da CD38/CD203a, especialmente em tumores sólidos (ALLARD; ALLARD; STAGG, 2020).

A ausência de alteração em CD73 pode indicar que o MAT, ao manter sua capacidade de gerar Ado, continua favorecendo a imunossupressão local, mesmo diante da redução de CD39. Isso reforça a necessidade de avaliar a expressão e atividade funcional dessas enzimas em múltiplos compartimentos (tecido tumoral, sangue periférico e células imunes) para entender melhor a dinâmica da sinalização purinérgica no CaB.

A análise realizada diretamente em tecido tumoral demonstrou-se fundamental para a compreensão mais precisa da dinâmica da via purinérgica no câncer de bexiga. A utilização

do tecido permitiu identificar a dissociação entre a expressão gênica de CD39 e CD73, fenômeno já descrito em outros modelos tumorais (ALLARD et al., 2017; LINDEN et al., 2019), mas cuja caracterização no MAT fornece maior robustez ao dado, uma vez que preserva as interações entre células tumorais, componentes do estroma e células imunológicas (BINNEWIES et al., 2018; HANAHAN, 2022). A ausência de alteração em CD73, mesmo diante da redução de CD39, reforça a hipótese de que o MAT mantém sua capacidade de gerar adenosina por vias alternativas, sustentando a imunossupressão local (STAGG et al., 2020; VIJAYAN et al., 2017). Tais evidências destacam a relevância do uso de tecido para a investigação de enzimas imuno regulatórias, dado que modelos experimentais isolados muitas vezes não contemplam a complexidade do ambiente tumoral (JIANG et al., 2018; JOYCE; FEARON, 2015). Dessa forma, os achados obtidos a partir do tecido reforçam o potencial translacional da análise e contribuem para a elucidação de mecanismos envolvidos na evasão imune tumoral.

O papel da inflamação na carcinogênese é amplamente discutido em virtude da inerência desta condição no MAT e sua repercussão no ambiente sistêmico. A inflamação é gerada por diversas vias, a quantidade de ATPe aumentada é uma delas, devido a capacidade de sinalização imunológica dentro do MAT, por meio da ligação com receptores P2X, a liberação de citocinas inflamatórias e também a proliferação de linfócitos (MORELLO et al., 2021; ZHANG et al., 2008). Além disso, destaca-se a desregulação entre os agentes oxidantes e antioxidantes como promotores da inflamação e da carcinogênese de diversas neoplasias, inclusive no CaB (WIGNER et al., 2021).

O estresse oxidativo pode ser desencadeado por hábitos de vida como o tabagismo, que é um dos principais hábitos modificáveis responsável pelo surgimento do CaB. Os dados demonstram que mais de 66% dos participantes do grupo CaB era ou foi fumante, destaca-se que tanto a fase gasosa quanto a fase alcatroada da fumaça do tabaco produzem grandes quantidades de EROs, sendo capazes de modificar lípidos, proteínas entre outras moléculas. No câncer, a modificação de proteínas através da carbonilação é um dos fatores relacionados à carcinogênese, este processo ocorre principalmente nas cadeias laterais de aminoácidos nativos em proteínas, por exemplo, histidina, cisteína e lisina, dando origem a derivados de carbonila, como aldeído e cetonas, responsáveis pelo dano ao DNA e a consequente formação tumoral (CALLIRI; TOMMASI; BESARATINIA, 2021).

No ambiente sistêmico dos pacientes com CaB, nossos achados de aumento do MDA e redução dos tióis proteicos são marcadores inequívocos de um estado de EO generalizado (ALI et al., 1992; NELSON & KIESOW, 1972; JENTZSCH et al., 1996; BADJATIA et al.,

2010; LEPARA et al., 2020; GUPTA et al., 2012). O MDA, um produto final da peroxidação lipídica, indica dano oxidativo às membranas celulares, enquanto a diminuição dos tióis proteicos (grupos sulfidríla essenciais para a função proteica e defesa antioxidante) reflete o consumo dessas defesas na tentativa de neutralizar as EROs em excesso (ELLMAN, 1959; MASELLA et al., 2005; STADTMAN & LEVINE, 2003; BULBULLER et al., 2013). Esse cenário sistêmico de desequilíbrio redox é uma característica comum em diversas neoplasias e pode contribuir para a progressão da doença (ROSSETTO et al., 2024).

O estudo de Lepara e colaboradores (2020) também evidenciou que pacientes com CaB apresentam níveis séricos aumentados de MDA em comparação ao grupo controle. O MDA é um produto da peroxidação de fosfolipídios da membrana, gerado pelo aumento do metabolismo do ácido araquidônico, devido aos níveis elevados de ciclooxigenase-2 (COX-2). Nesse sentido, evidenciou-se que células de CaB são caracterizadas pela expressão de COX-2, enquanto em células uroteliais normais, a expressão de COX-2 era indetectável (MARGULIS et al., 2007). Portanto, a via MDA/COX-2 pode estar intimamente envolvida na tumorigênese da bexiga.

Em resposta a essa sobrecarga oxidativa sistêmica, observamos um aumento significativo da Vitamina C no ambiente sistêmico dos pacientes. Essa molécula é um potente antioxidante hidrossolúvel, capaz de neutralizar radicais livres e proteger as células do dano oxidativo (ALMEIDA, 2008; OLIVEIRA et al., 2003; LONGCHAR & PRASAD, 2015; VERMA et al., 2021). Seu aumento sistêmico pode representar uma resposta compensatória do hospedeiro para combater o EO induzido pelo câncer, tentando mitigar os danos moleculares e celulares (GALLEY et al., 1997; LUO et al., 2018). Essa mobilização de antioxidantes exógenos pode ser crucial quando as defesas endógenas (como os tióis) estão comprometidas.

Não foi observada diferença nos níveis de EROs e MPO comparando os grupos estudados. Esses dados podem ser justificados pelo aumento de Vitamina C identificado no grupo CaB. O estudo de Oliveira e colaboradores (2003) demonstrou o efeito protetor da molécula em um modelo de câncer gástrico, a ingestão do componente promoveu a redução das EROs.

A cisplatina é um fármaco utilizado no tratamento de diversas neoplasias e no contexto do CaB é o principal agente quimioterápico utilizado. O estudo de Longchar e Prasad (2015) analisou o benefício do tratamento combinado com cisplatina e ácido ascórbico em camundongos portadores de linfoma de Dalton ascítico, e os resultados demonstraram a melhora da eficácia terapêutica principalmente através da redução de efeitos tóxicos teciduais

induzidos pela cisplatina, nas análises teciduais foi possível verificar uma diminuição na GSH, atividade da catalase e aumento da peroxidação lipídica em células tumorais, demonstrando o possível envolvimento desses componentes na eficácia do tratamento combinado. Nosso estudo, por outro lado, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos na análise de tióis não proteicos, cujo principal marcador é a GSH. Porém evidenciou-se o aumento de MDA, colaborando com os achados.

Ao analisarmos os níveis de tióis proteicos (PSH) percebeu-se uma redução no grupo CaB em relação ao grupo controle. De forma direta, a atividade antioxidante dessas moléculas está relacionada à presença do próprio grupamento -SH, que denomina esse grupo de substâncias e que tem a capacidade de acomodar elétrons desemparelhados, diminuindo a reatividade de inúmeras moléculas potencialmente perigosas ao organismo, sendo fundamentais, portanto, para o controle dos eventos oxidativos (MASELLA et al., 2005). Desse modo, é inegável a importância biológica que os compostos sulfidrílicos apresentam no controle da produção excessiva de EROs que é observada durante a carcinogênese. Estudos reforçam que o aumento de tióis séricos em pacientes oncológicos, pode estar relacionado com um maior grau de estadiamento tumoral e com um pior prognóstico (BULBULLER et al., 2013; ZANINI, 2014).

O SP e o EO estão profundamente interligados no MAT, formando um ciclo de retroalimentação que contribui para a progressão do câncer. O acúmulo de ATP extracelular, frequentemente observado em tumores, pode ocorrer em resposta a hipóxia, necrose tumoral e estímulos inflamatórios, todos eles associados ao aumento de EROs (DI VIRGILIO et al., 2020). Essas EROs, por sua vez, são as principais responsáveis pelo dano oxidativo observado nos níveis elevados de MDA e pela depleção de tióis proteicos, como identificado em nossos dados.

Ao mesmo tempo, o EO pode modular negativamente a expressão de enzimas purinérgicas, como a CD39, que foi reduzida na análise no MAT. Estudos mostram que ambientes com alto EO podem inibir a atividade de ectonucleotidases (CD39/CD73), favorecendo o acúmulo de ATP e impedindo a formação adequada de Ado (STAGG; SMITH, 2008). Isso perpetua uma condição pró-inflamatória e pró tumoral.

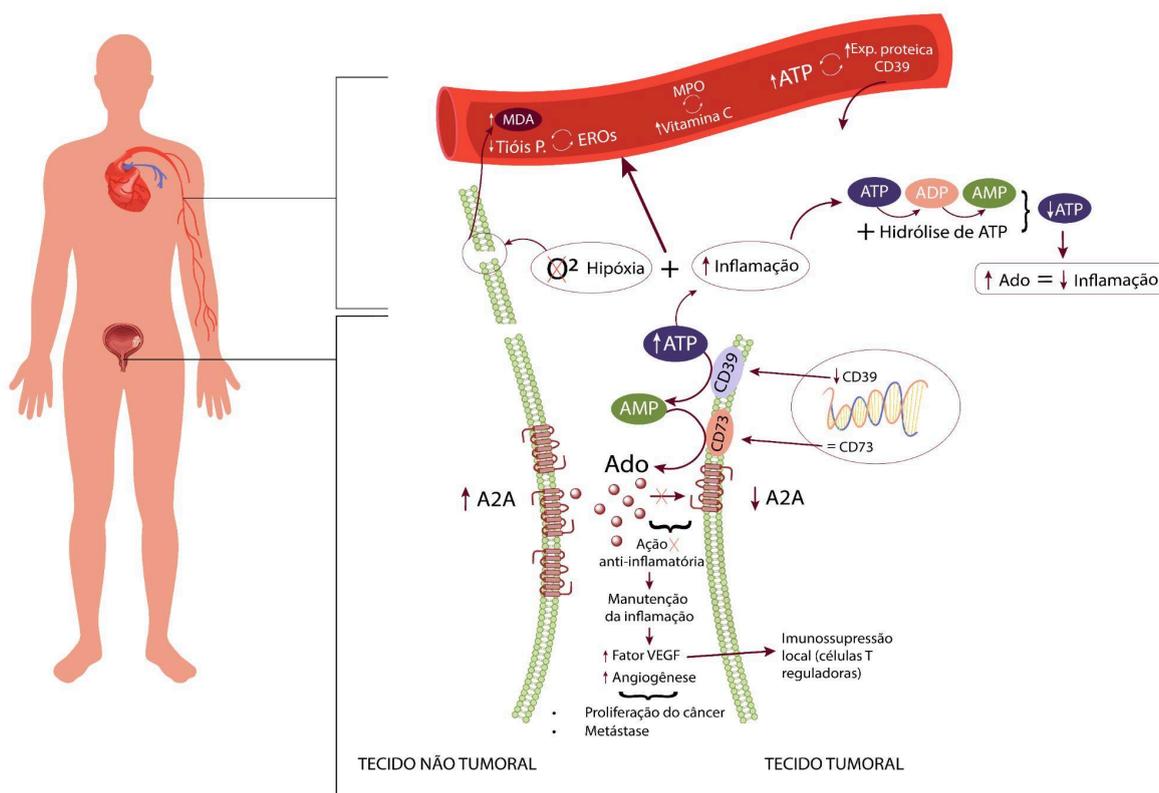
Além disso, a Ado gerada via CD73 (não alterada no estudo) normalmente exerce função imunossupressora, mas sua ação depende da presença do receptor A2A, que também apresentou-se reduzido no tecido tumoral, isso pode indicar que o EO também esteja interferindo na sensibilidade à Ado.

A ativação do receptor A2A nas células T promove efeitos imunossupressores como inibição da produção de IFN- γ e TNF- α , redução da proliferação e aumento da diferenciação de células T reguladoras (Treg) (OHTA, 2016). Dessa forma, a redução da expressão de A2A encontrada no tecido tumoral pode comprometer a capacidade da Ado em modular a inflamação local, favorecendo uma resposta inflamatória persistente. Adicionalmente, níveis elevados de ATP extracelular, somados à redução de CD39, favorecem a ativação de receptores P2, como o P2X7, intensificando a inflamação e potencialmente a progressão tumoral.

Estudos demonstram que o EO, particularmente por meio de EROs, pode reduzir a expressão de componentes da via purinérgica, incluindo o receptor A2A e a própria atividade das ectonucleotidases CD39 e CD73 (PETRUK et al., 2019). Essa ação oxidativa compromete a homeostase do MAT e pode perpetuar a inflamação local, influenciando a evasão imunológica e a progressão tumoral. Além disso, a Ado acumulada em um ambiente com A2A reduzido pode ativar outros receptores, como o A2B, que em certos contextos promovem angiogênese e proliferação celular (VIOLA et al., 2019).

Por outro lado, o aumento sistêmico de vitamina C pode representar uma tentativa compensatória do organismo em reduzir os efeitos deletérios do excesso de ATP e da inflamação. A vitamina C tem efeito modulador sobre vias redox e, indiretamente, pode influenciar a regulação da expressão gênica de receptores purinérgicos e enzimas associadas à inflamação crônica (VERMA et al., 2021).

Coletivamente, nossos dados apoiam a hipótese de que a via purinérgica, particularmente a regulação do ATP extracelular via CD39, está desregulada no CaB e associada ao aumento do EO. A distinção entre perfis locais e sistêmicos reforça a necessidade de abordagens integrativas para compreensão da dinâmica molecular tumoral. Além disso, os resultados destacam o potencial de CD39 como alvo terapêutico e/ou marcador prognóstico, especialmente em estágios iniciais da doença, como vem sendo sugerido em estratégias de imunoterapia combinada (VIJAYAN et al., 2017; BEAVIS et al., 2015).



Fonte: A autora (2025).

Figura 10. Interação entre EO, sinalização purinérgica e inflamação e suas repercussões no CaB. A hidrólise de ATPe por ectonucleotidases (CD39 e CD73) leva à formação de Ado, que pode se ligar a receptores A2A. No tecido não tumoral da bexiga, essa via promove efeitos anti-inflamatórios (maior expressão gênica de CD39 e A2A). No tecido tumoral, entretanto, ocorre diminuição da expressão de CD39 e A2A, além da elevação dos níveis de ATPe, o que favorece a inflamação crônica, proliferação, metástase e angiogênese. A hipóxia e a inflamação causam a lise celular, favorecendo o aumento do MDA e gerando EO (caracterizado por \uparrow MDA e \downarrow tióis proteicos). Entende-se que os níveis de EROs seguem inalterados pela ação antioxidativa dos tióis no tecido tumoral. O aumento de vitamina C pode modular a inflamação via redução da MPO, por esse motivo a molécula permanece sem alterações. O aumento da expressão proteica de CD39 pode ser uma tentativa adaptativa do organismo em reduzir os altos níveis de inflamação, favorecendo a quebra do ATPe e formando Ado, molécula anti inflamatória.

Adenosina trifosfato (ATPe); NTPDase-1 (CD39); Ecto-5'-nucleotidase (CD73); Adenosina (Ado); Malonaldeído (MDA); Espécies reativas de oxigênio (EROs); Mieloperoxidase (MPO).

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo revelam uma complexa interação entre o SP e o EO no CaB, caracterizada por uma desregulação compartimentalizada dos mecanismos moleculares e bioquímicos que regulam a inflamação, a resposta imune e a progressão tumoral. A redução da expressão gênica de CD39 no MAT, associada ao aumento de ATPe e à redução da expressão do receptor A2A, sugere a instalação de um ambiente inflamatório crônico, propício à evasão imunológica e à agressividade tumoral. Paralelamente, a expressão proteica aumentada de CD39 no ambiente sistêmico pode refletir uma resposta compensatória periférica, evidenciando a importância de se considerar compartimentos distintos na análise de biomarcadores.

O EO elevado, demonstrado pelo aumento de MDA e pela redução de tióis proteicos, reforça o cenário de instabilidade redox, com possível impacto direto na modulação da via purinérgica. A elevação de vitamina C no ambiente sistêmico possivelmente representa uma resposta antioxidante compensatória, embora insuficiente para restaurar a homeostase. Enquanto a manutenção da expressão de CD73 indica que a produção de Ado pode estar preservada, mas sua ação imunossupressora é provavelmente comprometida pela diminuição de A2A, o principal mediador desse efeito.

Esse descompasso funcional entre a geração e a sinalização da Ado contribui para a formação de um microambiente pró-inflamatório. Esses achados reforçam a relevância do eixo purinérgico-redox como elemento-chave na fisiopatologia do CaB e apontam para novas oportunidades terapêuticas que combinem moduladores da via purinérgica e antioxidantes, especialmente na estratificação entre subtipos músculo-invasivo e não músculo-invasivo.

REFERÊNCIAS

ALLARD, B. et al. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. **Immunological Reviews**, Hoboken, v. 276, n. 1, p. 121–144, mar. 2017a. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12528>.

ALLARD, B. et al. The adenosine pathway in immuno-oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, London, v. 14, n. 10, p. 611–629, 2017b. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.73>.

ALLARD, D. et al. Targeting CD73 in cancer immunotherapy: A new approach to improve anti-tumor immunity. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, p. 595204, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595204>.

ALLEN, F. et al. The adenosine pathway: A potential target in immunotherapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 248–267, 2022.

ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Formation of reactive oxygen species as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 637–648, 1992.

ALMEIDA, M. M. **Determinação e quantificação das vitaminas C e E associadas em produtos cosméticos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 22, n. 12, p. 879–891, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>.

ANTONIOLI, L. et al. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Pharmacology Reviews**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 345-382, jul. 2019.

BADJATIA, N. et al. Status antioxidante alterado e peroxidação lipídica em pacientes indianos com carcinoma urotelial da bexiga. **Urology Oncology**, [s. l.], v. 28, p. 360–367, 2010.

- BEAVIS, P. A. et al. CD73: A potential biomarker for anti-PD-1 therapy. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 75, n. 21, p. 4344–4353, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1384>.
- BINNEWIES, M. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 541–550, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>.
- BULBULLER, N. et al. Diagnostic value of thiols, paraoxonase 1, arylesterase and oxidative balance in colorectal cancer in human. **Neoplasma**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 419-424, 2013.
- CALIRI, A. W.; TOMMSI, S.; BESARATINIA, A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. **Mutation Research Reviews**, [s. l.], v. 787, p. 108365, jan.-jun. 2021. DOI: 10.1016/j.mrrev.2021.108365.
- COBBS, C. S. et al. Expressão da superóxido dismutase de manganês em tumores do sistema nervoso central humano. **Cancer Research**, [s. l.], v. 56, p. 3192–3195, 1996.
- DA SILVA, Á. C. et al. Preclinical evaluation of bozepinib in bladder cancer cell lines: modulation of the NPP1 enzyme. **Purinergic Signalling**, [s. l.], 31 out. 2023. DOI: 10.1007/s11302-023-09975-6.
- DeGEORGE, K. C.; HOLT, H. R.; HODGES, S. C. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, [s. l.], v. 96, n. 8, p. 507–514, 15 out. 2017. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29094888/>.
- DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP: A danger signal activating P2X7 receptor in cancer pathophysiology. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 8, p. 79, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079>.
- DI VIRGILIO, F. et al. P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 29, p. 17–25, 1 ago. 2016. DOI: 10.1016/j.coph.2016.05.001.
- DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, [s. l.], v. 36, p. 293-303, 2017. DOI: <https://www.nature.com/articles/onc2016206#citeas>.

DI VIRGILIO, F. et al. Purinergic signaling in the tumor microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 20, p. 601–618, 2020.

DOBRUCH, J.; OSZCZUDLOWSKI, M. Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions. **Medicina**, [s. l.], v. 57, n. 8, p. 749, 24 jul. 2021. DOI: 10.3390/medicina57080749.

DUGBARTEY, G. J. et al. Redox System and Oxidative Stress-Targeted Therapeutic Approaches in Bladder Cancer. **Antioxidants (Basel)**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 287, 26 fev. 2024. DOI: 10.3390/antiox13030287.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).

FERLAY, J. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

FERREIRA, J. M. et al. High CD39 expression is associated with the non-muscle-invasive phenotype of human bladder cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 12, n. 16, p. 1580-1586, 3 ago. 2021. DOI: 10.18632/oncotarget.28029.

GALLEY, H. F. et al. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 768–774, jan. 1997.

GUPTA, R. K. et al. Interações entre estresse oxidativo, perfil lipídico e antioxidantes no câncer de mama: um estudo de caso-controle. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 13, p. 6295–6298, 2012.

HAN, J. et al. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 129, p. 110393, 1 set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110393>.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HE, X. et al. Function of the P2X7 receptor in hematopoiesis and leukemogenesis.

Experimental Hematology, [s. l.], v. 104, p. 40-47, dez. 2021. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34687808/>.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>.

JAIN, A. et al. Oxidative stress and cancer: An update on its role in bladder cancer progression. **Antioxidants**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 117, 2017.

JELIC, M. D. et al. Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 22-28, jan.-mar. 2021. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_862_16.

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

JIANG, Y. et al. Modeling the tumor microenvironment with tissue engineering. Current Opinion. **Biomedical Engineering**, v. 6, p. 57–65, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.cobme.2018.04.001>.

JOYCE, J. A.; FEARON, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 74–80, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1126/science.aaa6204>.

KIRKALI, Z. et al. Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis.

Urology, New York, v. 66, n. 6 Suppl 1, p. 4–34, 2005. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.07.062>.

LEDDERROSE, S. et al. P2X1 and P2X7 Receptor Overexpression Is a Negative Predictor of Survival in Muscle-Invasive Bladder Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 2321, 16 abr. 2023. DOI: 10.3390/cancers15082321.

LEPARA, Z. et al. Nível sérico de malondialdeído (MDA) como um potencial biomarcador de progressão do câncer para pacientes com câncer de bexiga. **Romanian Journal of**

Internal Medicine, [s. l.], v. 58, p. 146–152, 2020.

LI, X. Y. et al. Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1754-1773, dez. 2019. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0541.

LIANG, S. et al. Accumulated ROS Activates HIF-1 α Induced Glycolysis and Exerts a Protective Effect on Sensory Hair Cells Against Noise-Induced Damage. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 8, p. 806650, 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2021.806650.

LINDEN, J.; CEKIC, C.; GUCKELBERGER, M. Purinergic signaling in the tumor microenvironment. *Current Opinion*. **Pharmacology**, v. 47, p. 72–78, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.02.006>.

LINDEN, J.; CUBILLOS-ROBLEDO, E.; CHOWDHURY, P. S. Adenosine: A multifaceted immunoregulator in cancer. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 22, p. 83–97, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00614-8>.

LIU, Z. et al. A Robust Hypoxia Risk Score Predicts the Clinical Outcomes and Tumor Microenvironment Immune Characters in Bladder Cancer. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 725223, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.725223.

LONGCHAR, A.; PRASAD, S. B. Biochemical changes associated with ascorbic acid-cisplatin combination therapeutic efficacy and protective effect on cisplatin-induced toxicity in tumor-bearing mice. **Toxicology Reports**, [s. l.], v. 2, p. 489-503, 7 fev. 2015. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.01.017.

LUO, J. et al. High-dose vitamin C induces oxidative stress and selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells. **Cell**, Cambridge, v. 160, n. 4, p. 490–503, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>.

MARGULIS, V. et al. Expressão da ciclooxigenase-2 no urotélio normal e carcinoma de células transicionais superficial e avançado da bexiga. **Journal of Urology**, [s. l.], v. 177, p. 1163–1168, 2007.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

MENDES, F. et al. Oxidative stress in bladder cancer: an ally or an enemy?. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 48, p. 2791–2802, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06266-4>.

MORELLO, S. et al. Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 2223, ago. 2021.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. **Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV)**.

Bethesda, MD: NAVAL MEDICAL RESEARCH INST, 1972.

OHTA, A. A metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment.

Frontiers in Immunology, [s. l.], v. 7, p. 109, 2016.

OLIVEIRA, C. P. et al. Protective effect of ascorbic acid in experimental gastric cancer: reduction of oxidative stress. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 446-448, mar. 2003. DOI: 10.3748/wjg.v9.i3.446.

ORNELAS, F. G. I. **Caracterização de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos**.

2013. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PATEL, V. G.; OH, W. K.; GALSKY, M. D. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 404–423, 7 ago. 2020. DOI: 10.3322/caac.21631.

PAZ, J. V. et al. O desafio presente no diagnóstico e no tratamento do câncer de bexiga.

Research, Society and Development, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 5-17, 4 abr. 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i5.28252.

PETRUK, G. et al. Oxidative stress-mediated downregulation of CD39/CD73 and adenosine A₂A receptor impairs immunosuppression in inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 134, p. 190–201, 2019.

ROCKENBACH, L. et al. NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 421–430, 26 jan. 2014. DOI: 10.1007/s11302-014-9405-8.

ROSETTO, L. B. et al. Relationship between purinergic signalling and oxidative stress in prostate cancer: Perspectives for future therapy. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 20, p. 145–162, 2024.

SCHUTT, F. et al. Moderately Reduced ATP Levels Promote Oxidative Stress and Debilitate Autophagic and Phagocytic Capacities in Human RPE Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [s. l.], v. 53, p. 5354-5361, ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9845>.

SHERIF, I. Uroprotective mechanisms of natural products against cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity: A comprehensive review. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 333–346, 30 set. 2020.

STAGG, J.; ALLARD, B.; ALLARD, D. Immunosuppressive functions of adenosine in cancer. Current Opinion. **Pharmacology**, v. 53, p. 90–97, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.08.003>.

STAGG, J.; SMITH, P. D. Extracellular adenosine signaling in cancer. **Cancer Research**, [s. l.], v. 68, p. 5941–5944, 2008.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, Berlin, v. 25, p. 207–218, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>.

SUL, O. J.; RA, S. W. Quercetina previne o estresse oxidativo e a inflamação induzidos por LPS pela modulação de NOX2/ROS/NF-kB em células epiteliais pulmonares. **Molecules**, [s. l.], v. 26, p. 6949, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26226949>.

SUZUKI, K. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 132, n. 2, p. 345–352, jul. 1983. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90019-2).

SVENNERSTEN, K. et al. Localization of P2X receptor subtypes 2, 3 and 7 in human urinary bladder. **BMC Urology**, [s. l.], v. 15, p. 81, 2015. DOI: 10.1186/s12894-015-0075-9.

VERMA, A. et al. The dual role of ascorbic acid in cancer: Antioxidant and prooxidant activity. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 11, p. 620724, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.620724>.

VIJAYAN, D. et al. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 17, p. 709–724, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86>.

VIOLA, A. et al. The metabolic checkpoint adenosine in the regulation of immune responses in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 645–657, 2019.

WHONGSIRI, P. et al. A proteína LINE-1 ORF1 é regulada positivamente por espécies reativas de oxigênio e associada à progressão do carcinoma urotelial da bexiga. [s. l.], v. 15, p. 143–151, 2018.

WIGNER, P. et al. The Interplay between Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in Bladder Cancer Development. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 4483, 25 abr. 2021. DOI: [10.3390/ijms22094483](https://doi.org/10.3390/ijms22094483).

YEGUTKIN, G. G.; BOISON, D. ATP and Adenosine Metabolism in Cancer: Exploitation for Therapeutic Gain. **Pharmacology Reviews**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 797-822, jul. 2022. DOI: [10.1124/pharmrev.121.000528](https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000528).

ZANINI, D. **Atividade de ectoenzimas do sistema purinérgico e análise de biomarcadores inflamatórios e estresse oxidativo em pacientes com câncer de pulmão**. 2014. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

ZHANG, Y.; LI, Y. Bladder cancer cells prevent cisplatin-induced oxidative stress by upregulating Nestin1 expression. **American Journal of Translational Research**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 11178-11193, 15 out. 2021.

ZHOU, Y. et al. The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 30, p. 48755–48768, 12 maio 2017. DOI: [10.18632/oncotarget.17835](https://doi.org/10.18632/oncotarget.17835).