

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

**VANDRIEL PEDONE DA ROSA**

**INIBIÇÃO DO GENE CD73 EM LINHAGEM DE CÂNCER DE BEXIGA: UMA  
ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA DE RESPOSTA A QUIMIOTERÁPICOS QUE  
ATUAM NA BIOSÍNTESE DE PURINAS**

**CHAPECÓ**

**2026**

**VANDRIEL PEDONE DA ROSA**

**INIBIÇÃO DO GENE CD73 EM LINHAGEM DE CÂNCER DE BEXIGA: UMA  
ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA DE RESPOSTA A QUIMIOTERÁPICOS QUE  
ATUAM NA BIOSÍNTESE DE PURINAS**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Margarete Dulce Bagatini

**CHAPECÓ**

**2026**


**VANDRIEL PEDONE DA ROSA**

**INIBIÇÃO DO GENE CD73 EM LINHAGEM DE CÂNCER DE BEXIGA: UMA  
ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA DE RESPOSTA A QUIMIOTERÁPICOS QUE  
ATUAM NA BIOSÍNTESE DE PURINAS**

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


**Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 07/05/2026.**

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA MACIEL  
Data: 08/05/2026 10:28:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel – UFFS  
Orientadora - Presidente (a)

Documento assinado digitalmente  
 ANDREIA MACHADO CARDOSO  
Data: 10/05/2026 15:40:54-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Machado Cardoso – UFFS  
Avaliador - Membro Interno

Documento assinado digitalmente  
 FERNANDA BUENO MORRONE  
Data: 12/05/2026 15:29:07-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Bueno Morrone - PUCRS  
Avaliador - Membro Externo

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pela vida, pela força e pela sabedoria concedidas ao longo de toda esta trajetória, tornando possível a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel, minha mais profunda e sincera gratidão. Sua orientação foi fundamental em cada etapa desta jornada. Sempre presente, esteve ao meu lado não apenas conduzindo este trabalho com excelência, mas também oferecendo apoio, escuta, incentivo e valiosas trocas de ideias que foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Sua dedicação, confiança e compromisso foram determinantes para que eu chegasse até a conclusão desta etapa. Sem o seu apoio constante, este trabalho não teria sido possível. Mais do que uma orientadora, foi a base que sustentou todo este percurso, sendo, sem dúvida, a parte mais importante desta conquista.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarete Dulce Bagatini, gratidão por estar sempre ao nosso lado ao longo desta jornada, oferecendo suporte às demandas necessárias durante o desenvolvimento desta pesquisa. Sua disponibilidade, suas contribuições, ideias e incentivo constante foram essenciais para o andamento e a conclusão deste trabalho.

Sua atuação foi fundamental em todas as etapas, sendo um importante pilar para que esta pesquisa pudesse ser realizada e concluída com êxito.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bueno Morrone e a todo o grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Aplicada da PUCRS, gratidão pela acolhida, pela receptividade e pelo apoio durante a etapa final deste trabalho. A oportunidade de realizar parte dos experimentos em seu laboratório foi fundamental para a conclusão desta pesquisa, contribuindo de maneira significativa para o seu desenvolvimento.

Agradeço também pela disponibilidade em integrar a banca avaliadora, colaborando com sua experiência e conhecimento para o aprimoramento deste estudo.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, coordenado pelo Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Jarbas Rodrigues de Oliveira, da PUCRS, e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Luft, gratidão pela acolhida, pela disponibilidade, pelos ensinamentos e dedicação em compartilhar os conhecimentos, especialmente na execução de técnicas fundamentais para a realização desta pesquisa

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Machado Cardoso, gratidão pela presença constante, pelo suporte ao longo desta trajetória e pela disponibilidade em integrar a banca avaliadora deste trabalho, enriquecendo este momento final com suas considerações e contribuições.

Por fim, agradeço a todos os professores que integram o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul, pelos ensinamentos e

conhecimentos compartilhados ao longo das disciplinas, fundamentais para a minha formação acadêmica.

Aos colegas de sala de aula e de laboratório, pelo convívio, pelas trocas de experiências e pelo apoio ao longo desta trajetória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo suporte financeiro concedido durante o período de execução desta pesquisa.

*“Towards the Hall of Bronzen Shields”*

- Falkenbach

## RESUMO

A ectonucleotidase CD73 tem sido amplamente reconhecida como um importante modulador do microambiente tumoral, sobretudo por sua participação na conversão de AMP em adenosina, promovendo imunossupressão e favorecendo a progressão tumoral. O presente estudo teve como objetivo correlacionar a expressão de CD73 como biomarcador da viabilidade celular frente ao tratamento com quimioterápicos indutores da morte celular, tais como: cisplatina, paclitaxel e doxorubicina, na linhagem T24 de câncer de bexiga, utilizando estratégia de modulação da tradução proteica por RNA de interferência e outra linhagem de células T24 CD73 *knockout*. A análise de expressão gênica não demonstrou aumento da expressão de CD73 na linhagem tumoral T24 em relação a um conjunto de amostras de tecido não tumoral da bexiga usado como controle. Em contrapartida, a expressão proteica evidenciou redução após tratamento com RNA de interferência, confirmando a modulação em nível de transcrição. Nos ensaios de viabilidade celular, a aplicação isolada ou combinada dos quimioterápicos na linhagem T24 não modificada não apresentou efeito significativo. Após o silenciamento de CD73 por RNA de interferência, observou-se alteração no perfil de resposta aos fármacos. Associações como cisplatina + paclitaxel e cisplatina + doxorubicina resultaram em redução significativa da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, indicando um efeito citotóxico potencializado em condições de modulação da via purinérgica. Na linhagem T24 CD73 *knockout*, a aplicação isolada de paclitaxel e cisplatina não promoveu redução significativa da viabilidade celular, enquanto a doxorubicina na menor concentração manteve efeito citotóxico. Nessa linhagem, em tratamentos associados, de modo geral, não foram observadas reduções significativas consistentes da viabilidade celular, sugerindo que a ausência de CD73 pode alterar a resposta às terapias combinadas. Em conjunto, os resultados indicam que o silenciamento ou inibição de CD73 exerce papel relevante na modulação da resposta celular na presença dos quimioterápicos cisplatina, doxorubicina e paclitaxel, isolados ou em combinação, influenciando mecanismos de resistência ou sensibilidade de acordo com o contexto experimental e a estratégia terapêutica adotada. Assim, a CD73 se destaca como um potencial biomarcador e alvo terapêutico promissor no câncer de bexiga.

**Palavras-chave:** CD73; Câncer de bexiga; Terapêutica; Sinalização Purinérgica.

## ABSTRACT

The ectonucleotidase CD73 has been widely recognized as an important modulator of the tumor microenvironment, mainly due to its role in the conversion of AMP into adenosine, promoting immunosuppression and favoring tumor progression. The present study aimed to correlate CD73 expression as a biomarker of cell viability in response to treatment with cell death-inducing chemotherapeutic agents, such as cisplatin, paclitaxel, and doxorubicin, in the T24 bladder cancer cell line, using a strategy of protein translation modulation through RNA interference, as well as a CD73 knockout T24 cell line. Gene expression analysis did not demonstrate increased CD73 expression in the T24 tumor cell line compared to a set of non-tumoral bladder tissue samples used as control. In contrast, protein expression showed a reduction after RNA interference treatment, confirming modulation at the transcriptional level. In cell viability assays, the isolated or combined application of chemotherapeutic agents in the unmodified T24 cell line did not show a significant effect. After CD73 silencing by RNA interference, a change in the drug response profile was observed. Combinations such as cisplatin + paclitaxel and cisplatin + doxorubicin resulted in a significant reduction in cell viability at all tested concentrations, indicating a potentiated cytotoxic effect under conditions of purinergic pathway modulation. In the CD73 knockout T24 cell line, the isolated application of paclitaxel and cisplatin did not promote a significant reduction in cell viability, while doxorubicin at the lowest concentration maintained a cytotoxic effect. In this cell line, combined treatments generally did not show consistent significant reductions in cell viability, suggesting that the absence of CD73 may alter the response to combination therapies. Overall, the results indicate that CD73 silencing or inhibition plays a relevant role in modulating cellular response in the presence of the chemotherapeutic agents cisplatin, doxorubicin, and paclitaxel, whether used alone or in combination, influencing resistance or sensitivity mechanisms depending on the experimental context and therapeutic strategy adopted. Thus, CD73 stands out as a potential biomarker and promising therapeutic target in bladder cancer.

**Keywords:** CD73; Bladder cancer; Therapeutics; Purinergic signaling.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01</b> – Fisiopatologia do Câncer de Bexiga e o Estadiamento Conforme os Estratos Vesicais.....	22
<b>Figura 02</b> – Sinalização Purinérgica, seus Principais Constituintes e a Interação entre Moléculas Purínicas com seus Receptores e Ectoenzimas Hidrolases Específicas.....	24
<b>Figura 03</b> – Sinalização Purinérgica Atrelada aos Mecanismos Invasores Tumorais e Promotores da Imunossupressão.....	26
<b>Figura 04</b> – Mecanismos de Ação da CD73 que Contribuem para a Progressão Tumoral...	29
<b>Figura 05</b> – Expressão Gênica de CD73.....	42
<b>Figura 06</b> – Expressão Proteica de CD73.....	43
<b>Figura 07</b> – Viabilidade Celular após Tratamento com Fármacos não Associados.....	43
<b>Figura 08</b> – Viabilidade Celular após Tratamento com Fármacos Associados.....	44
<b>Figura 09</b> – Viabilidade Celular após Silenciamento de CD73 e Tratamentos com Fármacos não Associados.....	45
<b>Figura 10</b> – Viabilidade Celular após Silenciamento de CD73 e Tratamentos com os Fármacos Associados.....	46
<b>Figura 11</b> – Viabilidade Celular na Linhagem T24 CD73 – KO e Tratamentos com Fármacos não Associados.....	47
<b>Figura 12</b> – Viabilidade Celular na Linhagem T24 CD73 – KO e Tratamentos com Fármacos Associados.....	47
<b>Figura 13</b> – Curvas de Kaplan – Meier para Desfechos Clínicos em Câncer de Bexiga de Acordo com a Expressão do Gene CD73.....	49

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01** – Dados Estatísticos entre Amostras Controle e Câncer de Bexiga T24..... 42

**Tabela 02** – Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e intervalo de confiança de 95%, conforme distribuição dos dados. Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) destacados em negrito..... 48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

**A2A** – Receptor de adenosina tipo 2A

**A2B** - Receptor de adenosina tipo 2B

**AC** – Adenilato Ciclase

**ADA** – Adenosina desaminase/deaminase

**ADP** – Adenosina Difosfato

**AKT** – Quinase Serina/Treonina

**AMP** – Adenosina Monofosfato

**AP-2** – Complexo Adaptador AP-2

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**BCG** – Calmette-Guérin

**BSA** – Albumina Sérica Bovina

**cAMP** -Adenosina Monofosfato Cíclica

**CB** – Câncer de Bexiga

**CBMI** – Câncer de Bexiga Músculo-Invasivo

**CBNMI** – Câncer de Bexiga Não Músculo-Invasivo

**CD39** – Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase

**CD73** – Ecto-5'-nucleotidase

**CD73** – KO – Proteína CD73 knockout

**cDNA** – DNA Complementar

**CRISPR Cas – 9** – Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats Cas – 9

**CT** – Controle

**CT-** - Controle Negativo

**Ct** – Cycle Threshold

**CT+** - Controle Positivo

**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**eADO** – Adenosina Extracelular

**eATP** – Adenosina Trifosfato Extracelular

**EJ** – Linhagem de Câncer de Bexiga

**ENPP** – Ectonucleotídeo Pirofosfatase Fosfodiesterase

**FGFR** – Fator de Crescimento de Fibroblastos

**GPCR** – Receptor Metabotrópico Acoplado à Proteína G

**GST** – Glutathione S-transferase

**HIF – 1-  $\alpha$**  – Fator Induzível por Hipóxia 1-  $\alpha$

**MAT** – Microambiente Tumoral

**MDM2** – Proteína Murina Double Minute 2

**MEM** – Optimum I Reduced – Serum Medium in an Improved Minimal Essential Medium

**mRNA** – RNA mensageiro

**MTT** - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

**NAT** – N-acetiltransferase

**NF- $\kappa$ B** – Fator Nuclear Kappa – B

**ns** – Não significativo

**NTC** – Negative Control

**NT5E** – Gene que expressa a proteína CD73

**P1** – Receptor Metabotrópico P1

**P2** – Receptor Metabotrópico P2

**P2X** – Receptor ionotrópico P2X

**P2Y** – Receptor Metabotrópico P2Y

**P53** – Proteína P53

**PBS** – Phosphate Buffered Saline

**P-gp/ABCB1** – Glicoproteína – P

**PI3K/AKT** – Fosfoinositídeo 3-quinase

**PLC** – Fosfolipase C

**PTEN** – Phosphatase and tensin homolog

**PUCRS** – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**PVDF** – Polivinilideno Difluoreto

**RAS** – Rat Sarcoma Vírus

**RB1** – Retinoblastoma 1

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**RNAiMAX** – RNA de interferência MAX

**RNA-seq** – RNA sequencing

**RT-qPCR** – Retrotranscrição e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**sgRNA** – RNA guia

**siRNA** – RNA de silenciamento

**SMAD's** – Small Mothers Agonist Decapentaplegic

**SP1** – Specificity Protein 1

**STAT** – Signal Transducers and Activation of Transcription

**T24** – Linhagem de Carcinoma de Células Transicionais da Bexiga

**TNM** – Tumor, nódulo e Metástase

**TOP2A** – DNA Topoisomerase II  $\alpha$

**TP53** – Tumor Protein P53

**UFFS** – Universidade Federal da Fronteira Sul

## LISTA DE SÍMBOLOS

**%** - Por cento

**Ca<sup>+2</sup>** - Cálcio iônico

**°C** – Graus Centígrados

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**h** – hora(s)

**K<sup>+</sup>** - Potássio iônico

**min** – minutos

**mL** – Mililitros

**Na<sup>+</sup>** - Sódio iônico

**ng** – Nanogramas

**ng/uL** – Nanograma por microlitro

**ug/mL** – Micrograma por mililitro

**uL** – Microlitros

**uM** – Micromolar

**V** – Volts

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
3.1 CÂNCER DE BEXIGA .....	20
3.2 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA .....	22
3.3 SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER .....	24
3.4 CD73 E CÂNCER .....	24
3.5 FÁRMACOS ANTITUMORAIS .....	29
<b>3.5.1 Cisplatina</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5.2 Paclitaxel</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5.3 Doxorrubicina</b> .....	<b>30</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>32</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO .....	32
4.2 EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR Cas9 DA LINHAGEM T24.....	33
4.3 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS T24 E T24 CD73-KO.....	34
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA, QUANTIFICAÇÃO, TRATAMENTO COM DNAse, SÍNTESE DE cDNA E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA RT-qPCR .....	34
4.5 APLICAÇÃO DE siRNA CONTROLE NEGATIVO, siRNA CONTROLE POSITIVO E siRNA ALVO CD73 .....	35
4.6 SILENCIAMENTO GÊNICO POR siRNA EM LINHAGEM T24 .....	36
4.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT .....	37
4.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR MTT E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS COM OS FÁRMACOS .....	39
4.9 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO	

DE CD73 E DESFECHOS CLÍNICOS EM CÂNCER DE BEXIGA .....	40
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
5.1 EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA .....	42
5.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR .....	43
5.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA DE PACIENTES .....	49
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das patologias que representa as principais causas de mortalidade em todo o mundo. (Sung, H. *et al.*, 2021). O surgimento de clones celulares malignos é um processo resultante de mecanismos intrínsecos preexistentes (Marine J. *et al.*, 2020). As células cancerígenas caracterizam-se por uma ampla variedade de vias sinalizadoras atreladas à proliferação celular, resistência à resposta imune, à apoptose, aumento da capacidade proliferativa e reprogramação do metabolismo (Yedav, U.P. *et al.*, 2020; Zaroni. M. *et al.*, 2022; Labrie, M. *et al.*, 2022).

Dentre os diferentes tipos de câncer, o de bexiga representa o mais comum do trato urinário. No ano de 2023, o diagnóstico para este tipo de câncer resultou em 549.393 pacientes com a doença e 199.922 óbitos em todo o mundo (INCA, 2023). Por ser uma doença de etiologia multifatorial, diferentes fatores de risco encontram-se associados para o seu desenvolvimento, entre estes pode-se destacar: a idade, exposição a agentes carcinogênicos, tal qual o tabagismo, o sexo, sendo mais prevalente em homens, e o estilo de vida, levando-se em consideração o sedentarismo, hábitos alimentares e o estresse. Quando ocorre o diagnóstico de câncer de bexiga, em cerca de 90% dos casos, o tumor é do tipo urotelial ou também denominado transicional. Já nos 10% dos casos restantes, o tumor pode ser diagnosticado como do tipo músculo-invasivo, quando as células tumorais se encontram inseridas nas camadas mais profundas da parede da musculatura lisa da bexiga, dando origem à metástase (Dobruich J. *et al.*, 2021).

A sinalização purinérgica exerce um importante papel nos processos tumorais, pois está envolvida na disseminação e progressão tumoral (Marine, J. *et al.*, 2020). O conjunto de reações desencadeadas pelo trifosfato de adenosina extracelular (eATP) e seus produtos de hidrólise, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e adenosina (ADO), compõem moléculas sinalizadoras estimulando as respostas celulares.

O eATP pode ser reconhecido por duas séries de receptores, os canais iônicos P2X e os receptores metabotrópicos P2Y (Di Virgilio, F. *et al.*, 2018). No meio extracelular, o eATP é rapidamente hidrolisado por ação da ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (CD39) gerando como produtos o ADP, que também pode sofrer ação da CD39, e gerar o AMP, sendo este convertido em ADO, pela ecto-5'-nucleotidase (CD73) (Lindem, J. *et al.*, 2019). A ADO pode interagir com os receptores metabotrópicos do tipo P1, que induzem um dos principais

mecanismos promotores de imunossupressão e resistência à resposta imune anti-tumoral (Boison, D., & Yegutkin, G.G. 2019) No câncer de bexiga, esta via de sinalização para formação de ADO atua justamente pela expressão de CD73, tornando, assim como nos demais tumores, um importante biomarcador de condições imunossupressoras que favorecem a progressão e resistência tumoral.

A alta incidência e mortalidade do câncer, especialmente do câncer de bexiga, ressalta a importância de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na progressão tumoral e na resistência terapêutica. Nesse contexto, a sinalização purinérgica destaca-se como um importante modulador do microambiente tumoral, particularmente por meio da conversão do eATP em ADO, mediada pelas ectonucleotidases CD39 e CD73. A ADO exerce efeitos imunossupressores que favorecem a progressão tumoral e a evasão da resposta imune. Assim, a CD73 emerge como um potencial biomarcador de condições imunossupressoras, justificando sua investigação no câncer de bexiga como alvo relevante para o entendimento da viabilidade celular frente a terapias antineoplásicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar a ectonucleotidase CD73 como biomarcador da viabilidade celular frente a resposta à aplicação de quimioterápicos indutores da apoptose, avaliando seus efeitos em associação com a aplicação de RNA de interferência (siRNA) e potencial inibição da expressão de CD73.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão proteica de CD73 e a viabilidade celular em linhagem de câncer de bexiga e em linhagem de câncer de bexiga *CD73 knockout*, antes e após o tratamento com quimioterápicos em diferentes concentrações;
- Padronizar e aplicar siRNA para o silenciamento em linhagem celular de câncer de bexiga;
- Comparar a viabilidade celular entre células de câncer de bexiga com CD73 inibido na presença e ausência dos quimioterápicos em diferentes concentrações;
- Investigar se a inibição de CD73 potencializa ou reduz os efeitos citotóxicos dos quimioterápicos, sugerindo um possível papel funcional na resistência ou sensibilidade ao tratamento.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CÂNCER DE BEXIGA

O câncer de bexiga (CB) é o 10º câncer mais comum mundialmente, contando 573.278 novos casos e 212.536 mortes registradas no ano de 2020 (*World Cancer Research Fund International*). O CB acomete 9,6 a cada 100.000 homens e 2,4 a cada 100.000 mulheres (Saginala K. *et al.*, 2020), sendo a 6ª principal causa de câncer masculino e a 17ª em mulheres (*World Cancer Research Fund International*). Mais de 90% dos casos de CB são classificados como carcinomas de células uroteliais ou também descritos como carcinomas de células transicionais (Gandhi J. *et al.*, 2022).

O CB tem origem no estrato urotelial, podendo invadir as camadas mais profundas deste epitélio, incluindo a lâmina própria (uma fina camada de vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo), a musculatura própria (grandes feixes espessos de músculo liso) e, o tecido conjuntivo adiposo, que circunda a camada muscular própria e separa a bexiga dos demais órgãos ao seu redor (Gandhi J. *et al.*, 2022). O câncer que se espalha do tecido conjuntivo adiposo para os músculos da bexiga pode invadir os linfonodos e metastizar para os demais órgãos do corpo. Quanto aos fatores de risco, mutações genéticas adquiridas estão associadas à causa mais comum do CB (Jubber I. *et al.*, 2023; Mossanen M. *et al.*, 2021).

Mutações adquiridas em genes supressores como o retinoblastoma 1 (RB1) e do *tumor protein P53* (TP53), além de oncogenes como *RAt Sarcoma vírus* (RAS) e do receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), encontram-se atrelados ao desenvolvimento do CB. Em algumas raras ocasiões, os pacientes podem apresentar uma predisposição congênita ao CB, tal como a expressão de glutathione S-transferase (GST) e a N-acetiltransferase (NAT), que são enzimas codificadas por genes que impedem a desintoxicação de carcinógenos uroteliais pelo paciente. Indivíduos que possuem estas enzimas expressas apresentam um elevado risco de CB, podendo este risco ser potencializado por outros fatores, tal como o uso da nicotina (Jubber I. *et al.*, 2023; Mossanen M. *et al.*, 2021).

O tabagismo é o principal fator de risco para o CB, sendo responsável por 30 a 60% dos casos e contribuindo com o aumento do risco de forma dose-dependente. A combustão do tabaco produz mais de 62 carcinógenos que aumentam as chances de desenvolvimento do CB. Ainda, a exposição a hidrocarbonetos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas e poluentes atmosféricos aumentam as chances do CB. Por fim, o uso de determinados fármacos, como a ciclofosfamida, um fármaco citotóxico usado tanto para

quimioterapia quanto para imunossupressão, produz o metabólito acroleína, que propicia a cistite hemorrágica e à mutagênese da bexiga urinária (Bjurlin MA. *et al.*, 2021).

O sinal mais comum do CB é a hematúria, podendo esta condição ser indolor em 80% dos pacientes que recebem o diagnóstico. Ainda, pacientes com CB também podem apresentar infecções recorrentes do trato urinário, acompanhado de poliúria, ardência ao urinar e retenção da urina (Flaig TW. *et al.*, 2020; Meeks JJ. *et al.*, 2021; Hinkle JL. *et al.*, 2022). Os carcinomas uroteliais podem apresentar dois padrões divergentes de tumorigênese com significado prognóstico e sobrevida a longo prazo muito diferentes. Podem ser classificados como câncer de bexiga não músculo-invasivo (CBNMI) ou câncer de bexiga músculo-invasivo (CBMI). A avaliação da invasão muscular orienta a abordagem cirúrgica com ressecção com ou sem instilações de bacilo Calmette Guérin (BCG) ou cistectomia radical com ou sem quimioterapia ou imunoterapia neoadjuvante (Bjurlin MA. *et al.*, 2021).

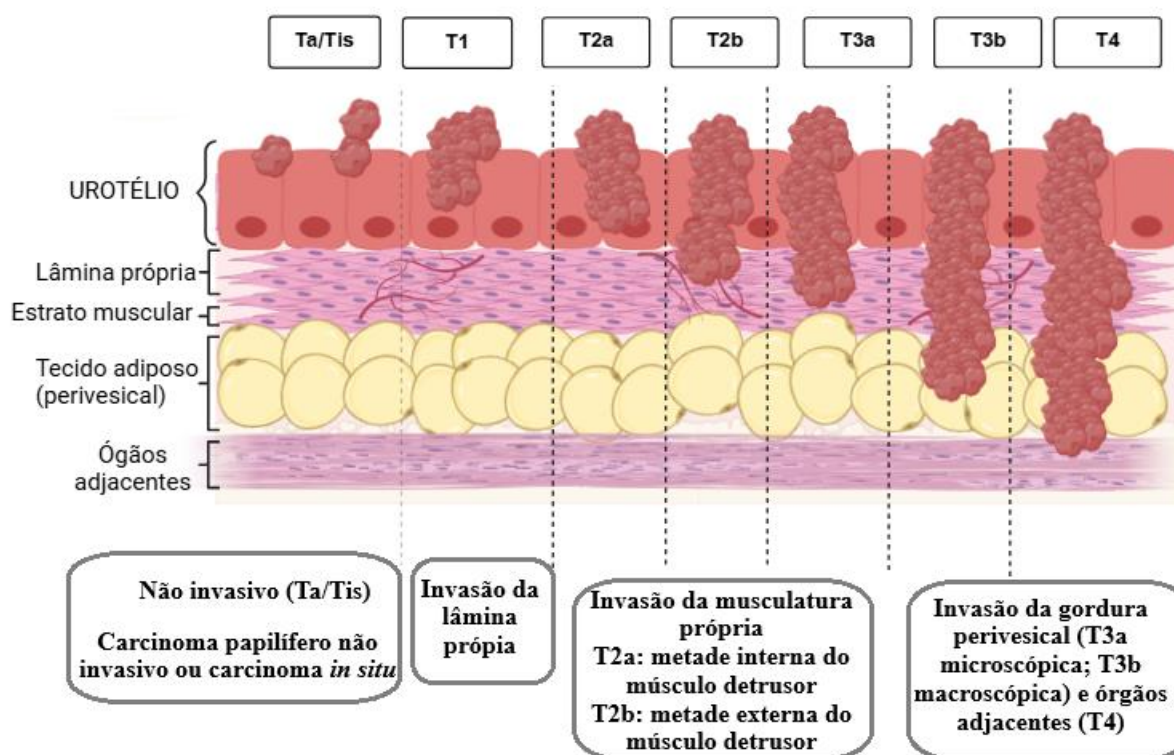
O sistema TNM é utilizado para o estadiamento do CB. Conforme este sistema, o CBNMI pode ser subclassificado em Ta (carcinoma papilífero não invasivo), Tis (carcinoma *in situ* não invasivo) ou T1 (invasão da lâmina própria). Já para o CBMI, este pode ser subdividido em T2a (invasão da metade interna do músculo detrusor) ou T2b (invasão da metade externa da musculatura própria). Tais subdivisões se baseiam no prognóstico, sendo que a doença do tipo T2b possui um risco significativamente maior de metástase linfonodal (14% vs 30%, respectivamente), resultando em menor sobrevida livre de recorrência após cistectomia. Em contrapartida, a abordagem terapêutica para as doenças T2a e T2b são semelhantes, uma vez que essa diferenciação nem sempre é viável. Ainda, a categoria T3, definida como doença localmente avançada, é subdividida em invasão microscópica (T3a) e macroscópica (T3b) da gordura perivesical. A disseminação extravesical para estruturas circundantes (órgãos pélvicos ou parede pélvica ou abdominal) indica a categoria T4 (Bjurlin MA. *et al.*, 2021).

A categoria N é definida pelo envolvimento de linfonodos regionais (N1-N3); a categoria M constitui o envolvimento de linfonodos não regionais (M1a) ou metástase à distância (M1b) (Alifrangis C. *et al.*, 2019). O CBNMI representa de 80 a 85% dos tumores de bexiga, tratando-se principalmente de lesões papilares, multifocais, com baixa malignidade. É muito incomum a invasão da musculatura própria (10% dos casos); porém, são considerados precursores os CBNMI, caso não diagnosticado e tratado imediatamente.

As lesões Ta possuem uma taxa de recorrência de cerca de 55% e uma progressão de estadio de cerca de 6% dentro da bexiga. Em contrapartida, lesões T1 de alto grau apresentam uma taxa de recorrência de cerca de 45% e uma progressão de 17% (Alifrangis C. *et al.*, 2019). O

CBNMI inclui todos os tumores uroteliais de alto grau e é altamente associado à disseminação metastática; a taxa de sobrevivência global de 5 anos para tumores T2 é 68% após um procedimento cirúrgico radical e de 25-30% para tumores que invadem estruturas circundantes (Kardoust Parizi M. *et al.*, 2019).

**Figura 01:** Fisiopatologia do câncer de bexiga e o estadiamento conforme os estratos vesicais



Legenda: Ta/Tis: Caracterização de estratos de câncer de bexiga não músculo-invasivo. T1: Início da invasão da lâmina própria. T2a: Invasão da musculatura própria sendo a metade interna do músculo detrusor e T2b metade externa do músculo detrusor. T3a, T3b e T4: Invasão da gordura perivesical e órgãos adjacentes. Desenvolvido em: <https://www.biorender.com/>

### 3.2 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Hoje é amplamente aceito que o ATP, e outros nucleotídeos (ADP, AMP) e o nucleosídeo ADO, atuam como importantes mensageiros celulares modulando diferentes vias de sinalização e participação nos mais diversos processos fisiológicos e patológicos, através da interação com receptores de membrana específicos. Os receptores purinérgicos podem ser

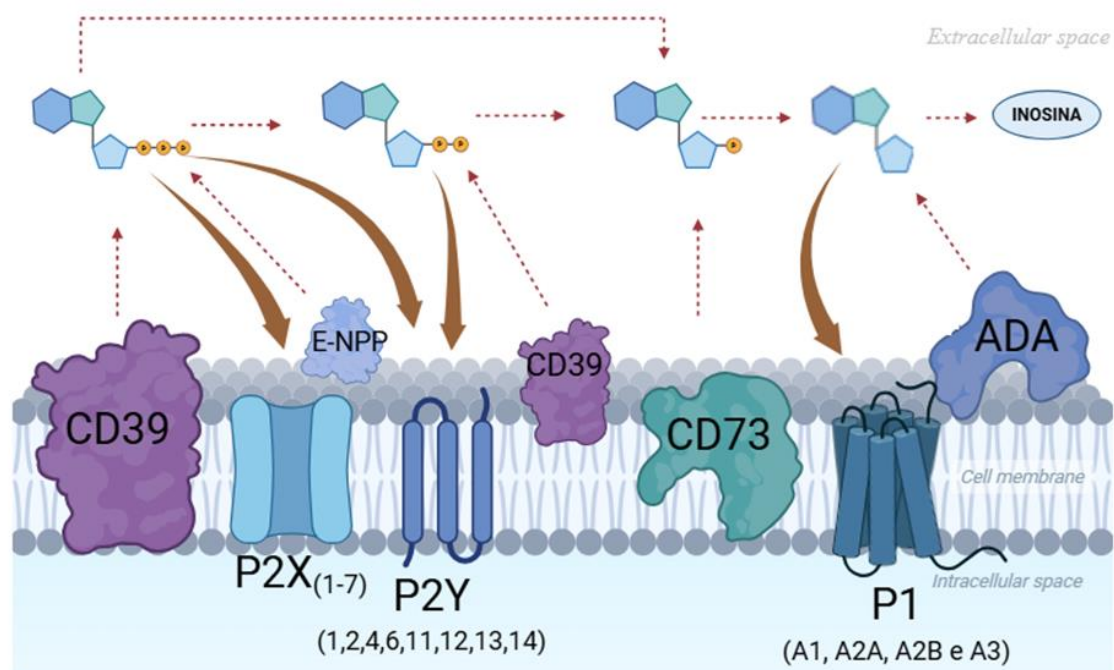
classificados em duas famílias: P1, sensíveis à ADO; e P2, sensíveis a nucleotídeos de adenina. Na família P1, são característicos os receptores metabotrópicos acoplados à proteína G (GPCR). Estes podem ser classificados em A1, A2A, A2B e A3. A1 e A3 são acoplados à subunidade Gi/o, logo, inibem AC e a síntese de adenosina monofosfato cíclica (cAMP); A2A e A2B são acoplados à subunidade Gs, desencadeando o estímulo da síntese de cAMP ao ativar AC. Já os receptores P2 podem ser divididos em duas subfamílias, sendo a primeira P2X, formados por canais catiônicos controlados por ligantes e constituídos por complexos homotriméricos ou heterotriméricos de subunidades conhecidas (P2X<sub>1</sub> – P2X<sub>7</sub>). Na subfamília P2Y são encontrados os P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, e P2Y<sub>11-14</sub>. Tais receptores podem ser estimulados por ATP (P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>11</sub>) e ADP (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub>). P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub> encontram-se acoplados a proteínas G<sub>q</sub>; portanto, sua ativação leva ao estímulo da fosfolipase C (PLC), à renovação de fosfoinositídeos e à mobilização de Ca<sup>+2</sup>. P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e P2Y<sub>14</sub> estão acoplados a proteínas Gi, inibindo adenilato ciclase (AC) (Di Virgilio, F. *et al.*, 2018).

O ATP atua como um ligante canônico dos receptores P2X e estes quando ativados promovem a despolarização rápida a partir do influxo de Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> e o efluxo de K<sup>+</sup> (Campos-Contreras ADR. *et al.*, 2020), também podendo interagir com receptores P2 ou ser desfosforilado/hidrolisado por um conjunto de enzimas ectonucleotidasas denominadas ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (CD39), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (ENPP) (Campos-Contreras ADR. *et al.*, 2020). A ADO extracelular (eADO) pode interagir com receptores P1, conforme sua sequência e propriedades de sinalização. Por fim, a eADO e sua sinalização são controlados pela hidrólise através da adenosina desaminase (ADA) e transportados para o interior da célula através de transportadores de nucleosídeos (Boison D. *et al.*, 2019).

Quando as células se encontram injuriadas ou submetidas a estresse em virtude de alterações na pressão osmótica e deformação mecânica, como mecanismo de resposta ocorre o extravasamento de ATP para o meio extracelular (Rockenbach L. *et al.*, 2014). Além deste mecanismo, o ATP pode ser extrudado por fenômenos controlados em resposta a diferentes estímulos celulares. Tais fenômenos envolvem o efluxo através de canais e transportadores de membrana (conexinas, panexinas, canais maxi-aniônicos, canais regulados por volume e transportadores ABC), receptores purinérgicos (P2X<sub>7</sub>) e extrusão mediada por vesículas exossomais (Campos-Contreras ADR. *et al.*, 2020). O ATP liberado no espaço extracelular ativa a comunicação parácrina e autócrina e sua hidrólise leva a uma cascata de moléculas de sinalização adicionais. A grande maioria, senão todos os tipos celulares, expressam um conjunto de receptores purinérgicos e ectonucleotidasas levando a flutuações constantes na

proporção das concentrações intra e extracelulares de ATP e ADO, o que corresponde a diferentes respostas fisiológicas e patológicas perante o comportamento celular.

**Figura 02:** Sinalização purinérgica, seus principais constituintes e a interação entre moléculas purínicas com seus receptores e ectoenzimas hidrolases específicas.



Legenda: CD39: Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase. E-NPP: Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase. P2X: Receptor ionotrópico. P2Y: Receptor metabotrópico. CD73: Ecto-5'-nucleotidase. P1: Receptor metabotrópico. ADA: Adenosina desaminase/deaminase. Desenvolvido em: <https://www.biorender.com/>

### 3.3 SISTEMA PURINÉRGICO E CÂNCER

A complexa organização das células cancerígenas dentro do tumor e as interações que ocorrem destas células com o organismo compreende o microambiente tumoral (MAT). O MAT é constituído por todas as interações entre as células tumorais e as células não malignas, como as células do endotélio, fibroblastos e células imunes. Os componentes estruturais, celulares e bioquímicos deste microambiente modulam o metabolismo, a migração e a proliferação das células cancerígenas, além de influenciar a resposta imune do hospedeiro (Campos-Contreras ADR. *et al.*, 2020).

Na sinalização purinérgica associada ao câncer, o ATP e a ADO estão presentes em altas concentrações no MAT (Di Virgilio, F. *et al.*, 2018). Dependendo dos tipos de tecidos tumorais e linhagens de células cancerígenas, a expressão dos receptores purinérgicos e ectonucleotidases CD39/CD73 variam gerando diferentes respostas celulares que podem depender do contexto celular e dos elementos específicos que constituem a sinalização purinérgica; sendo estas variações denominadas de purinoma (Liu, H. *et al.*, 2019). O eATP, assim como a eADO, atuam como marcadores bioquímicos para o câncer, em virtude dos seus significativos níveis no interstício tumoral. A liberação de ATP e ADO pelas células cancerígenas e a posterior ativação dos receptores purinérgicos e vias intracelulares encontram-se atreladas a diversos modelos de câncer, como, por exemplo, em células de câncer de pulmão humano, células derivadas de carcinoma ovariano, células de câncer de próstata e bexiga e células tumorais ascíticas de Ehrlich (Calik, I. *et al.*, 2019).

As ectonucleotidases CD39 e CD73, desempenham um importante mecanismo na modulação dos níveis de ATP e ADO no MAT. Praticamente todos os tipos de células podem liberar ATP para fora da célula; logo, todas as células na interface tumor-hospedeiro podem contribuir para a quantidade substancial de eATP. Desta forma, os nucleotídeos extracelulares atuam como uma interface de interação com as células cancerígenas, onde o eATP pode agir como um sinal de “encontre-me”, estimulando as células do sistema imune ao reconhecimento das células tumorais. Em contrapartida, o ATP pode ser hidrolisado pelo conjunto de ectonucleotidases, gerando ADO, cujo mecanismo antagônico ao ATP encontra-se relacionado à evasão do reconhecimento e ataque imunológico, embora os nucleotídeos presentes no estroma tumoral possam atuar como mensageiros parácrinos-autócrinos, estimulando respostas celulares específicas em todos os tipos de células que constituem a massa tumoral. (Di Virgilio, F. *et al.*, 2018).

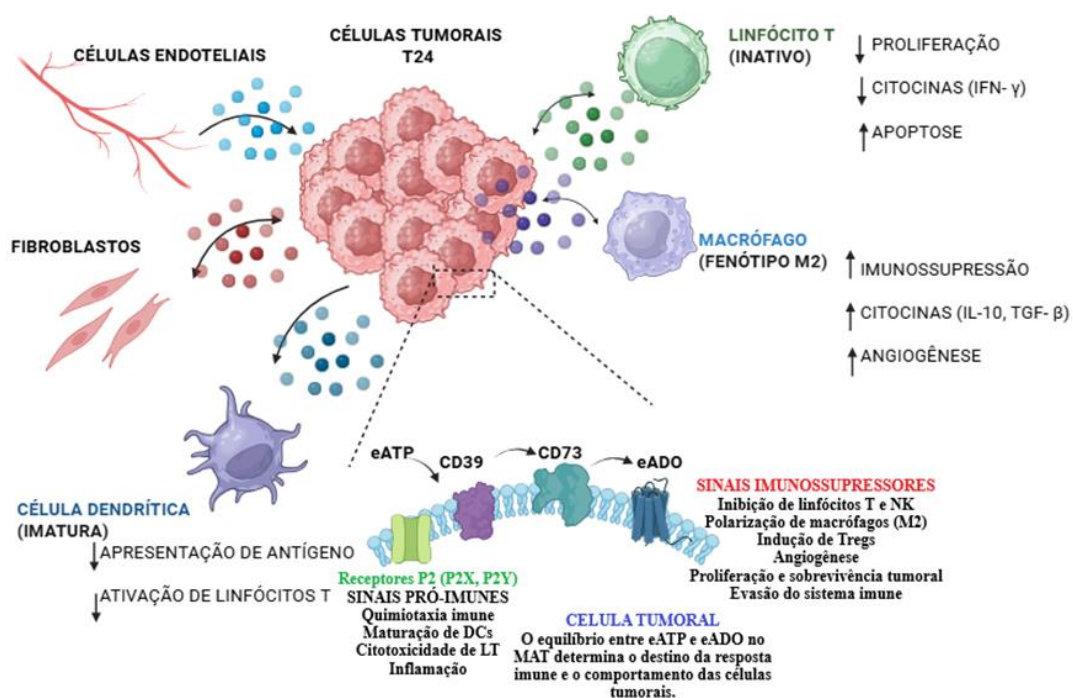
As ações parácrinas-autócrinas dos nucleotídeos e nucleosídeos de purinas concentram-se num fenômeno de retroalimentação que une a produção e liberação de ATP pelas células cancerígenas com o subsequente estímulo à proliferação celular e progressão tumoral. Desta forma, os mecanismos de sinalização de eATP são dependentes da presença e diversidade dos receptores específicos na própria célula que libera o nucleotídeo e nas células ao seu redor, assim como das ações das ectonucleotidases que definirão os ligantes que estão presentes no meio (Ma. D.F. *et al.*, 2018).

Os receptores para ADO encontram-se expressos em diferentes tecidos tumorais de diferentes órgãos. Os receptores A2A e A2B são os mais caracterizados no câncer, onde sua superexpressão pode ser encontrada em diferentes linhagens celulares derivadas de carcinoma

hepatocelular, carcinoma colorretal (Ma. D.F. *et al.*, 2018) e carcinoma urotelial de bexiga (Zhou, Y. *et al.*, 2017). Corroborando o papel dos receptores A2A e A2B na progressão do câncer, estudos demonstram que a inibição farmacológica ou genética desses receptores leva à redução da proliferação celular (Ma. D.F. *et al.*, 2018; Zhou, Y. *et al.*, 2017). Além do que, a expressão de A2A pode ser encontrada descrita em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata e bexiga, câncer de mama e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Wilkat, M. *et al.*, 2020).

Em todos estes tecidos, o A2B atuou efetivamente como um promotor da proliferação celular, além de que, a inibição de sua expressão em linhagens celulares EJ e T24, derivadas de carcinoma urotelial de bexiga, inibiu a proliferação celular e interrompeu as células na fase G1 durante a interfase do ciclo celular (Zhou, Y. *et al.*, 2017). Levando em consideração que o equilíbrio entre nucleotídeos e nucleosídeos reflete nos sinais autócrinos e parácrinos que regulam o crescimento tumoral, os elementos de sinalização purinérgica como transportadores, receptores e ectonucleotidases surgem como importantes alvos terapêuticos farmacológicos e biomarcadores para modulação da progressão tumoral.

**Figura 03:** Sinalização purinérgica atrelada aos mecanismos invasores tumorais e promotores da imunossupressão.



Legenda: Atuação dos mecanismos imunossupressores por ação da sinalização purinérgica relacionada à função de CD73 e formação de adenosina. Além dos mecanismos ativadores

da invasão e progressão tumoral relacionados à adenosina. Desenvolvido em:  
<https://www.biorender.com/>

### 3.4 CD73 E CÂNCER

A atividade catalítica da CD73 leva à hidrólise de AMP para a conversão em ADO (Bach N. *et al.*, 2023). Além de sua função catalítica, CD73 pode ter um papel na adesão celular e como receptor de proteínas da matriz extracelular (Minor, M. *et al.*, 2019). A CD73 é liberada da membrana celular pela clivagem da região glicosilfosfatidilinositol (GPI) através da hidrólise ou por ação de fosfolipases que geram CD73 solúvel. Ainda, a CD73 pode ser liberada por meio de vesículas extracelulares após sua ativação por células T ou células tumorais (Wang, M. *et al.*, 2021; Lu, T. *et al.*, 2022).

O promotor gênico que regula a transcrição de NT5E, o gene que codifica CD73, apresenta diferentes sítios de ligação aos fatores de transcrição relacionados ao fator induzível por hipóxia 1- $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ), complexo adaptador AP-2 (AP-2), *specificity protein 1* (SP1), proteínas *signal transducers and activators of transcription* (STAT) e *smad mothers Against decapentaplegic* (SMAD's) e elementos responsivos ao cAMP (Kordaß, T. *et al.*, 2018). Em condições inflamatórias, a expressão de CD73 induzida por hipóxia atua como um mecanismo de proteção ao tecido contra danos gerados pela supressão da resposta imune mediada pela ADO (Lee, J. *et al.*, 2019). No MAT hipóxico, as células tumorais sequestram esse mecanismo utilizando deste como um efeito benéfico e favorecedor à sobrevivência e crescimento tumoral (Bach N. *et al.*, 2023).

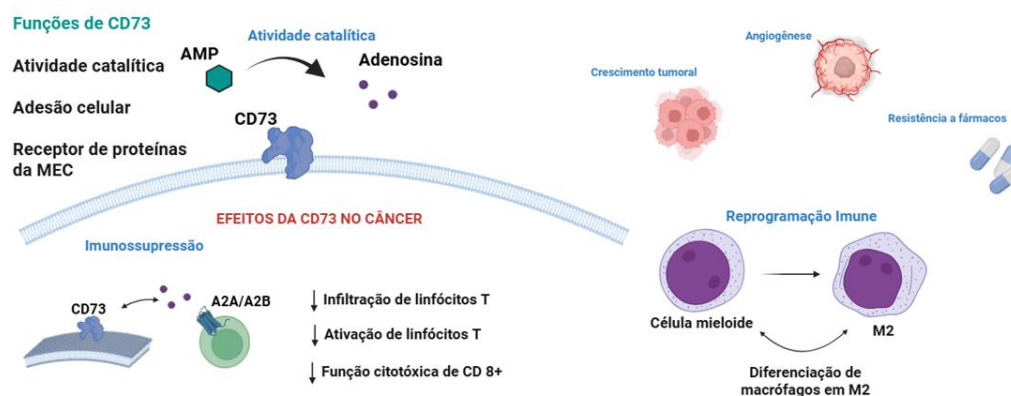
Além da regulação transcricional, a expressão de CD73 é regulada epigeneticamente (Bach N. *et al.*, 2023). Dados de expressão gênica de uma coorte de pacientes com câncer mostram que o RNA mensageiro (mRNA) de CD73 se encontra superexpresso na grande maioria dos tumores sólidos humanos, quando em comparação com tecidos saudáveis correspondentes (Jiang, T. *et al.*, 2018). Em contrapartida, a expressão de CD73 é heterogênea entre diferentes tipos de câncer humano, sendo alta em glioblastoma, carcinoma de tireoide, sarcoma, carcinoma pancreático, carcinoma de células renais, carcinoma de bexiga e carcinoma esofágico, porém, uma menor expressão é observada em câncer de mama, colangiocarcinoma, melanoma e câncer de cabeça e pescoço (Yang, H. *et al.*, 2021; Tang, K. *et al.*, 2022; Li, H. *et al.*, 2022; Jeong, Y.M. *et al.*, 2020).

A expressão de CD73 em células não tumorais, mas que se encontram presentes no MAT circundando o tumor também pode contribuir para um ambiente promotor de tumores em virtude do aumento da atividade da via purinérgica. Entre os tipos celulares que expressam CD73 e demais enzimas relacionadas à sinalização purinérgica, encontram-se os macrófagos associados ao tumor, linfócitos B, células supressoras derivadas de mielóides e fibroblastos associados ao câncer (Bach N. *et al.*, 2023). A expressão de CD73 em fibroblastos associados ao câncer é elevada pelo estímulo do receptor A2B, gerando um circuito de retroalimentação positiva e desencadeando a produção excessiva de ADO concomitante ao aumento da condição de imunossupressão (Yu, M. *et al.*, 2020).

Além da sua atuação na supressão imunológica, a CD73 favorece o crescimento tumoral, angiogênese e resistência a fármacos (Bach N. *et al.*, 2023), sendo, portanto, um promissor alvo terapêutico (Ghalamfarsa, G. *et al.*, 2019). No câncer, a CD73 promove o crescimento tumoral ao impedir a infiltração e ativação dos linfócitos T (Bach N. *et al.*, 2023), prejudicando a função citotóxica das células T CD8+ infiltrantes do tumor (Faraoni, E. Y. *et al.*, 2023). A CD73 também pode alterar a função de outras células do sistema imune, como, por exemplo, a diferenciação de células mielóides em macrófagos M2 promotores do crescimento tumoral (Jacobberger-Foissac, C. *et al.*, 2023).

Levando em consideração o envolvimento da CD73 na progressão do câncer, as altas expressões de CD73 nos tecidos cancerígenos demonstram um valor prognóstico negativo, o que aumenta as chances de progressão da doença e metástase (Allard, D. *et al.*, 2019). Desta forma, CD73 atua como um potencial biomarcador que indica a magnitude da resposta ao tratamento em diferentes tipos de câncer. A mensuração de CD73 e a sinalização da produção de ADO podem ser úteis para o rastreamento de pacientes à terapia modulatória via sinalização purinérgica (Rockenbach L. *et al.*, 2013). Como não é possível medir os níveis extracelulares de ADO na rotina clínica, outros marcadores e assinaturas genéticas específicas da sinalização de ADO têm sido investigados como biomarcadores (Siders, B. *et al.*, 2020). Logo, a inibição de CD73 representa um efeito antitumoral promissor considerando o silenciamento e a combinação com a terapia farmacológica e a imunoterapia (Yang, H. *et al.*, 2021).

**Figura 04:** Mecanismos de ação de CD73 que contribuem para a progressão tumoral.



Legenda: Ação angiogênica, resistência farmacológica, reprogramação imune e crescimento tumoral relacionado à formação de adenosina via sinalização purinérgica.

Desenvolvido em: <https://www.biorender.com/>

### 3.5 FÁRMACOS ANTITUMORAIS

#### 3.5.1 Cisplatina

O CB é sensível à quimioterapia, especialmente aos regimes à base de cisplatina. Por muito tempo, a quimioterapia à base de cisplatina tem sido o principal tratamento farmacoterapêutico no CB metastático, trazendo benefícios significativos à sobrevivência dos pacientes (KH. *et al.*, 2025). A farmacodinâmica citotóxica da cisplatina atua principalmente pela interação com o DNA após a infiltração nas células tumorais. A formação de adutos covalentes com o DNA leva a reações de hidratação pela incorporação de íons hidroxila ao DNA, fazendo com que a cisplatina se ligue mais facilmente às bases nitrogenadas no interior da dupla hélice e forme ligações covalentes com os átomos N7 presentes entre as bases nitrogenadas guanina e adenina. Essas modificações permitem o desenrolamento e distorção da dupla-hélice, inviabilizando a transcrição e replicação, levando à parada do ciclo celular e ativação da cascata apoptótica (Xie, M. *et al.*, 2024).

Apesar dos mecanismos antitumorais ativados pela cisplatina, uma parcela dos pacientes é considerada ineligível para quimioterapia por conta da sua toxicidade, especialmente a nefrotoxicidade. E, ainda, alguns subtipos histológicos complexos de CB podem oferecer resistência à cisplatina atenuando sua eficácia. (Alifrangis, C. *et al.*, 2019). Portanto, as quimioterapias combinadas à base de cisplatina tornaram-se importantes terapias

adjuvantes para pacientes em tratamento contra o CB, em virtude da maioria dos pacientes desenvolver progressivamente resistência ao fármaco (Xie, M. *et al.*, 2024).

### 3.5.2 Paclitaxel

O paclitaxel constitui uma molécula bioativa com propriedades anticancerígenas bem documentadas. Sua interação com diferentes genes modula respostas ao ataque anti-tumoral em diferentes tipos de câncer (Farooqi, A. *et al.*, 2018; Rutz, J. *et al.*, 2020; Hernández-Prat, A. *et al.*, 2019). Sendo um agente quimioterápico extraído da casca da planta *Taxus sp*; suas propriedades antitumorais compreendem a regulação positiva da proteína *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), que age recrutando a proteína P53, suprimindo o crescimento e proliferação das células tumorais. A PTEN quando ativada impede a fosforilação da proteína quinase serina/treonina (Akt) e da proteína murina double minute 2 (MDM2), inviabilizando a expansão tumoral (Khan, K. *et al.*, 2020). Ainda, o paclitaxel atua promovendo a despolimerização dos monômeros de tubulina, induzindo a morte celular pelo bloqueio mitótico (Sridhar, SS. *et al.*, 2020, Yu, DL. *et al.*, 2020; Sharifi-Rad, J. *et al.*, 2021), sendo, portanto, eficaz contra células em fases G2 e M do ciclo e amplamente utilizado na quimioterapia do CB.

Por conta destes mecanismos, o paclitaxel pode ser administrado em abordagens terapêuticas em sinergia com outros fármacos de uso no tratamento do câncer. No entanto, a resistência ao paclitaxel no tratamento do CB também pode ser observada pela redução da eficácia terapêutica e prejuízo no prognóstico clínico. Os mecanismos subjacentes a esta resistência não são bem compreendidos, o que ressalta a importância de investigação sobre os mecanismos biológicos e moleculares atrelados ao desenvolvimento da resistência a este fármaco (Rutz, J. *et al.*, 2020).

### 3.5.3 Doxorrubicina

A doxorrubicina é um fármaco quimioterápico eficaz sendo comumente utilizado como tratamento padrão ouro para o câncer. Dentre os seus mecanismos de ação, a interrupção do reparo do DNA e a geração de radicais livres torna este fármaco uma das drogas mais potentes (Packer EM. *et al.*, 2023). Em específico, a doxorrubicina interage com a DNA topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A), topoisomerase que age desenrolando o DNA compactado durante a transcrição e replicação formando quebras e reconexão de fita simples (Sahabi, K. *et al.*,

2022). Nesse processo, as células tumorais podem recorrer a mecanismos de superação a efeitos citostáticos, como o aumento do efluxo de fármacos, metabolismo de depuração do fármaco, reparo do DNA e resistência à apoptose (Packer EM. *et al.*, 2023).

A resistência à doxorubicina também é uma barreira para o insucesso da terapia anti-tumoral limitando significativamente sua aplicação clínica em virtude de potenciais efeitos colaterais (Li Z, *et al.*, 2022). Entre os principais mecanismos envolvidos destacam-se a superexpressão de transportadores de efluxo, como a glicoproteína-P (P-gp/ABCB1), que reduz o acúmulo intracelular do fármaco, além de alterações em vias de sinalização celular associadas à sobrevivência, como fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K)/AKT e o fator nuclear kappa-B (NF-κB). Adicionalmente, mudanças no estado redox celular e na dinâmica mitocondrial contribuem para a diminuição da indução de apoptose, favorecendo a sobrevivência tumoral mesmo na presença do quimioterápico. A modulação de enzimas antioxidantes e o aumento da capacidade de reparo de danos ao DNA também desempenham papel central nesse contexto, reforçando o fenótipo resistente observado em diferentes tipos de câncer (Li Z. *et al.*, 2022; Packer EM. *et al.*, 2023).

Estratégias terapêuticas que visam contornar a resistência à doxorubicina têm sido amplamente investigadas, incluindo o uso de inibidores de bombas de efluxo, terapias combinadas com agentes que modulam vias de sobrevivência celular e abordagens baseadas em siRNA para o silenciamento gênico específico (Xie, M. *et al.*, 2024). Nesse sentido, a identificação de biomarcadores moleculares, como a ectonucleotidase CD73, pode contribuir significativamente para a compreensão da resposta celular ao tratamento quimioterápico, permitindo a estratificação de pacientes e a otimização de protocolos terapêuticos (KH. *et al.*, 2025).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de uma análise experimental *in vitro* utilizando as linhagens de células transicionais de câncer de bexiga humano T24 e T24 knockout para o gene CD73 (CD73-KO), obtida por *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/Cas9* (CRISPR/Cas9). Adicionalmente, tecidos de bexiga não tumoral foram utilizados como controle, sendo provenientes de áreas adjacentes livres de tumor coletadas no momento da biópsia, conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS (CAAE: 87508918.4.0000.5564).

As linhagens celulares foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bueno Morrone, responsável pelo Laboratório de Farmacologia Aplicada da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). A linhagem T24 representa um modelo de alto grau (grau 3) de invasividade muscular, sendo amplamente utilizada em ensaios experimentais para avaliação de viabilidade celular após tratamento com fármacos e compostos indutores de morte celular. Por sua vez, a linhagem T24 CD73-KO está associada à redução da capacidade invasiva celular e à interrupção da sinalização mediada por adenosina (ADO), resultando em menor potencial de invasão e progressão tumoral, além de favorecer a resposta imune antitumoral (Mantwill et al., 2023).

Neste estudo foram realizadas análises de expressão gênica e proteica nos seguintes momentos:

- Expressão gênica de CD73 na linhagem T24 previamente à aplicação de siRNA e pré-tratamentos com os quimioterápicos;
- Expressão proteica de CD73 nas linhagens T24 pré e pós aplicação de siRNA e T24 CD73-KO, sem tratamentos com os quimioterápicos.

Já os ensaios de viabilidade celular na linhagem T24 foram realizados nos seguintes momentos:

- Pré-aplicação de siRNA e tratamentos dos quimioterápicos não associados;
- Pré-aplicação de siRNA e tratamentos dos quimioterápicos associados;
- Pós-aplicação de siRNA e tratamentos dos quimioterápicos não associados;
- Pós-aplicação de siRNA e tratamentos dos quimioterápicos associados.

Os ensaios de viabilidade celular na linhagem T24 CD73-KO foram realizados nos seguintes momentos:

- Pós-tratamentos com os quimioterápicos não associados;
- Pós-tratamentos com os quimioterápicos associados.

#### 4.2 EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR Cas9 DA LINHAGEM T24

O gene CD73 foi editado na linhagem T24 com plasmídeo de edição genética CRISPR/Cas9 pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (PX459) e o RNA guia (sgRNA) projetado para CD73. Os vetores ligados foram transferidos para as células T24 e realizado a extração plasmidial pós-transferência. O alvo do plasmídeo CRISPR/Cas9, CD73, foi transfectado com Lipofectamine 300 Transfection Reagent (Thermo Scientific) por 24 horas, sendo realizado a seleção com puromicina (10 µg/mL) por 3 dias. Após o crescimento, ensaios de Western Blotting e RT-qPCR foram realizados para avaliar o nocaute. As células em que não houve a edição gênica foram identificadas como células T24 selvagens, enquanto as células de controle negativo foram denominadas de negative control (NTC) T24 (Rockenbach L. *et al.*, 2014).

Os primers projetados para os sgRNA's utilizados foram:

mm-CD73-sg1- forward: 5' – CACCgCCCACTCAGCGTCCGCTTC-3', reverse: 5' – AAACGCAGCGGCACGTCTGAGTGGC-3'

mm-CD73-sg2- forward: 5' – CACCgCCTCTAGCACATCAGATATC-3', reverse: 5' – AAACGATATCTGATGTGCTAGAGGC – 3'

hu-CD73-sg1- forward: 5' – CACCgCGCCCTGCGCTACGATGCCA – 3', reverse: 5' – AAACGGCATCGTAGCGCAGGGCGC – 3'

hu-CD73-sg2- forward: 5' – CACCgTGTGGACGTCGTGGTGGG – 3', reverse: 5' – AAACCCACCCACGACGTCCACACC – 3'

#### 4.3 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS T24 E T24 CD73-KO

Ambas as linhagens celulares foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico e antifúngico. As células foram mantidas em incubadora de cultura celular com atmosfera úmida e contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) à temperatura de 37 graus centígrados (°C).

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE RNA, QUANTIFICAÇÃO, TRATAMENTO COM DNase, SÍNTESE DE cDNA E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA RT-qPCR

O RNA total da linhagem T24 foi isolado utilizando o reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific), conforme as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do RNA extraído foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop One/OneC (Thermo Scientific). Foram consideradas as razões de absorbância A260/A280 e A260/A230 como indicadores de pureza, sendo os valores registrados para posterior análise.

Para eliminação de possíveis contaminações por DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Thermo Scientific), conforme protocolo do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 200 ng de RNA utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Scientific). Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20°C até sua utilização.

A análise da expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), utilizando o sistema QuantStudio™ 7 Pro Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) e o reagente PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix. Foram utilizados primers específicos para o gene alvo CD73 e para o gene de referência β-actina (sequências *forward* e *reverse* para β-actina (ACTB) e CD73, respectivamente: F: 5'-GATGCAAGAAGGAGATCACTGC-3', R: 5'-AGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3'; F: 5'-GTGCCTTTGATGAGTCAGGTAG-3', R: 5'-TTCCTTTCTCTCGTGTCCTTG-3'). As reações foram conduzidas em volume final de 10 µL, contendo 3 µL de cDNA (aproximadamente 10 ng), primers forward e reverse, SYBR Green Master Mix e água ultrapura. As condições de amplificação incluíram etapa inicial a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, e 40 ciclos de amplificação (95°C por 15

segundos e 60°C por 1 minuto). Ao final, foi realizada curva de dissociação (melting curve) para verificação da especificidade dos produtos amplificados.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata técnica. Os valores de Cycle Threshold (Ct) foram obtidos e utilizados para cálculo da expressão gênica relativa pelo método do  $\Delta\Delta Ct$ , utilizando o gene ACTB como controle endógeno e uma amostra calibradora como referência. A expressão relativa foi determinada pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

#### 4.5 APLICAÇÃO DE siRNA CONTROLE NEGATIVO, siRNA CONTROLE POSITIVO E siRNA ALVO CD73

A linhagem T24 foi tripsinizada e plaqueada com meio DMEM em placa de 6 poços com número total de  $1 \times 10^6$  células por poço. Após o plaqueamento, as células foram mantidas em incubadora de cultura de células por 24h antes da aplicação das respectivas siRNAs, sendo utilizado um poço para cada aplicação de siRNA.

O tubo contendo a solução de *Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (RNAiMAX) (Thermo Scientific)* foi brevemente vortexado e dado *spin* para completa homogeneização do conteúdo. Após, aspirou-se 27 uL do conteúdo e este foi transferido para microtubo contendo 450 uL de meio *Opti-MEM™ I Reduced-Serum Medium is an improved Minimal Essential Medium (MEM) (Thermo Scientific)*. A solução foi homogeneizada e armazenada em geladeira até sua utilização.

Inicialmente, foi dado *spin* no tubo contendo *MISSION® siRNA Universal Negative Control #1 (Sigma-Aldrich)* e o conteúdo liofilizado foi ressuspensionado com 100 uL de água ultrapura ficando a uma concentração de 100 micromolar (uM) de solução mãe. Para o preparo da solução trabalho a 10 uM, procedeu-se a diluição 1:10 em microtubo, este foi vortexado, dado *spin* e devidamente identificado como siRNA controle negativo solução trabalho a 10 uM.

A partir da solução de trabalho, a solução de transfecção foi preparada utilizando 3 uL da solução trabalho adicionando 150 uL de meio de transfecção *MEM*. Para a diluição de *MISSION® esiRNA targeting human KIF11 Positive Control (Sigma-Aldrich)*, procedeu-se os mesmos passos de homogeneização e ressuspensão do liofilizado com o mesmo volume de 100 uL, porém, com tampão Tampão TE, 10X concentrado, solução estéril. pH 8,0 (*NOVA BIOTECNOLOGIA*), ficando a solução mãe a uma concentração de 200ng/uL. A solução foi vortexada e dado *spin* e o preparo da solução de transfecção ocorreu utilizando 3 uL da solução mãe com 150 uL de meio de transfecção *MEM*. Por fim, a diluição de *MISSION® esiRNA*

*targeting human NT5E (Sigma-Aldrich)* seguiu os mesmos passos de homogeneização e ressuspensão. O liofilizado foi ressuspensionado com 250 uL de tampão TE ficando a uma concentração de 200ng/uL. Vórtex e *spin* foram realizados e o preparo da solução de transfecção ocorreu com 3 uL da solução mãe e 150 uL de meio de transfecção *MEM*.

Em um microtubo correspondente a cada siRNA, a solução de transfecção foi preparada contendo 150 uL de lipofectamina *RNAiMAX* com meio *MEM*, acrescido de 150 uL de cada siRNA. Com o reagente de transfecção pronto, este foi incubado por 5 min a temperatura ambiente e armazenado em geladeira até sua aplicação na placa. A placa contendo as células e o meio, após as 24h de incubação, foi removida da incubadora e as células observadas em microscopia de luz. O meio foi removido de cada poço e lavado com 2 mL de solução fisiológica 0,9%. Após, aplicou-se o volume de 1.750 uL de meio *MEM* e então, em cada poço devidamente identificado, foi aplicado um volume de 250 uL do respectivo reagente de transfecção de siRNA controle negativo, controle positivo e CD73. A placa foi fechada, levemente homogeneizada e levada à incubadora de cultura celular por 72h.

#### 4.6 SILENCIAMENTO GÊNICO POR siRNA EM LINHAGEM T24

A linhagem celular T24 foi submetida à tripsinização e posteriormente plaqueada em placas de 6 poços, na densidade de  $1 \times 10^6$  células por poço, em meio DMEM. Após o plaqueamento, as células foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo a adesão celular antes da transfecção.

O processo de silenciamento gênico foi realizado utilizando o reagente Lipofectamine™ RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), conforme protocolo do fabricante. Inicialmente, o reagente de transfecção foi diluído em meio Opti-MEM™ Reduced-Serum Medium e mantido sob condições adequadas até sua utilização. Os siRNAs utilizados incluíram: controle negativo (MISSION® siRNA Universal Negative Control #1), controle positivo (MISSION® esiRNA targeting human KIF11) e siRNA específico para o gene NT5E (CD73) (MISSION® esiRNA targeting human NT5E), todos obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich). Os oligonucleotídeos liofilizados foram ressuspensionados conforme especificações do fabricante, preparados em soluções estoque e posteriormente diluídos para obtenção das soluções de trabalho utilizadas nos ensaios de transfecção.

Para a formação dos complexos de transfecção, os siRNAs foram diluídos em meio MEM e combinados com a solução de Lipofectamine™ RNAiMAX previamente preparada, sendo incubados por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a formação dos complexos lipossomais. Após 24 horas de incubação inicial, o meio de cultura das células foi removido e as células foram lavadas com solução fisiológica estéril (0,9%). Em seguida, foi adicionado meio MEM fresco a cada poço, seguido da aplicação dos complexos de transfecção contendo os respectivos siRNAs (controle negativo, controle positivo e CD73). As células foram então incubadas por 72 horas em condições padrão de cultura celular.

#### 4.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT

Passadas as 72h de incubação após aplicação das siRNAs, todo volume de reagente de transfecção contido nos poços foi removido. Os poços foram lavados com 1 mL de *phosphate-buffered saline* (PBS) e aplicados 100 uL da solução inibidora de protease *Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-free* (100x) (*Sigma-Aldrich*). Após, com uma ponteira de 1 mL, as células aderidas ao fundo do poço foram “raspadas” e lavadas com a solução inibidora de protease. O conteúdo formado após a raspagem foi transferido para microtubo e centrifugado a 15.000g por 10 min a 4 °C. Terminado a centrifugação, o conteúdo sobrenadante foi distribuído para novos microtubos. As amostras de proteínas extraídas foram armazenadas a -20 °C.

Do microtubo contendo a proteína extraída, aspirou-se 2 uL de proteína e transferiu-se para novo microtubo contendo 38 uL de *RIPA Lysis and Extraction Buffer* (*Sigma-Aldrich*), sem inibidor. A solução foi homogeneizada e armazenada em geladeira até sua utilização.

A curva padrão de proteína foi preparada a partir de uma solução estoque de albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 2000 µg/mL. As diluições foram realizadas em tampão RIPA, obtendo-se concentrações finais de 1500, 1000, 750, 500, 250 e 125 µg/mL por meio de diluição seriada. Cada ponto da curva foi preparado em volume final de 200 µL. Ao lado de cada ponto da curva, foram pipetados, em duplicata, 9 uL da solução de proteína extraída contendo *RIPA Lysis and Extraction Buffer* (*Sigma-Aldrich*), sem inibidor.

O volume de 12 uL de proteínas extraídas foi pipetado junto com 12 uL de *Laemmli SDS sample buffer* (*Sigma-Aldrich*), em microtubo, esta solução foi homogeneizada, levada ao termociclador e incubado a 5 min na função *boil* (aquecimento). Terminado o tempo de incubação, nas canaletas subsequentes à canaleta do marcador de peso molecular, pipetou-se

12 uL da solução proteica *Laemmli SDS sample buffer* (Sigma-Aldrich), referente a cada proteína extraída após aplicação das respectivas siRNAs.

A ordem de pipetagem das canaletas foi, da esquerda para direita: marcador de peso molecular *Gel Loading Dye, Blue (6X)* (New England Biolabs), siRNA controle negativo, siRNA controle positivo, T24, T24 CD73 silenciado e T24 CD73-KO. Com as amostras pipetadas nas canaletas do gel, deu-se início a corrida por um período inicial de 10 min e voltagem de 90 V (volts); passados os primeiros 10 min, aumentou-se a voltagem para 130 V e o tempo de corrida foi de 1 h e 30 min.

O tampão de transferência foi preparado com os seguintes reagentes: 100 mL de tris glicina 10x, 100 mL de metanol e 800 mL de água destilada. Para a montagem do sanduíche, preparou-se o suporte de transferência submerso ao tampão de transferência, na sequência foi posicionado a malha de transferência, o filtro de transferência, o gel de corrida, a membrana de transferência - polivinilideno difluoreto (PVDF), o filtro de transferência, a malha de transferência e selado o “sanduíche”. Após, conectou o “sanduíche” ao cassete de transferência, que depois foi acoplado à cuba de transferência e esta preenchida até sua marcação com o tampão de transferência. Por fim, a corrida para a transferência se deu por 1h e 30 min, a 100 V.

Terminado a corrida de transferência das proteínas, o “sanduíche” foi desfeito e a membrana de transferência lavada com *ponceau*. Terminado a lavagem, o *ponceau* foi removido e a membrana lavada 3 vezes com PBS e Twin num intervalo de 3 min cada e novamente lavada somente com PBS, também por 3 vezes com intervalos de 3 min cada, todas as lavagens foram feitas sob agitação.

O anticorpo primário anti-CD73 *Anti-CD73 antibody ab133582* (Abcam) foi diluído 1:1000 em PBS, Twin e BSA e acrescido à membrana de transferência que ficou incubado por 3h sob agitação. Passado o período de incubação do anticorpo primário anti-CD73, a membrana foi lavada nas mesmas condições de tempo e intervalo com PBS e Twin e somente PBS. Terminado as lavagens, aplicou-se o anticorpo secundário *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody* (Sigma-Aldrich) que foi preparado a uma diluição 1:2000 em uma solução de leite desnatado em pó, PBS e Twin e aplicado à membrana que ficou sob agitação por 1 hora. O anticorpo anti-  $\beta$ -tubulina, marcador constitutivo, foi preparado a uma diluição 1.1000 em solução BSA diluída em PBST e Twin. Após, acrescentou-se à membrana de transferência e foi deixado agitar por 3h.

Terminado o período de agitação com os anticorpos, as soluções foram descartadas e uma nova lavagem da membrana com PBS – Twin e somente PBS foi iniciada, com as mesmas

condições de frequência e tempo de lavagem. Após as lavagens, a membrana foi incubada com aplicação do reagente *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher Scientific)*, sendo aplicado 1 mL de luminol e 1 mL de solução de peróxido à membrana, após aplicação destes reagentes, a membrana foi incubada por 5 min no escuro e procedido à leitura a -10°C no Fotodocumentador (*L- Pix Chemi Express*).

#### 4.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR MTT E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS COM OS FÁRMACOS

As células T24 e T24 CD73-KO foram tripsinizadas e plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^6$  células por poço. Após 24h de incubação, as células não submetidas ao silenciamento foram tratadas com os fármacos, isoladamente ou em combinação. Para as células submetidas ao silenciamento transcricional, o protocolo de transfecção foi realizado previamente, seguido de incubação por 72 h antes da aplicação dos tratamentos farmacológicos. Além disso, um grupo controle foi mantido apenas com o silenciamento, sem exposição aos fármacos. Aquelas que receberam o silenciamento, tiveram o protocolo de silenciamento replicado e foram incubadas 72h antes da aplicação dos fármacos isolados e associados. Assim como àquelas que receberam apenas o silenciamento, mas não tiveram tratamento com os fármacos.

Os fármacos cisplatina, paclitaxel e doxorrubicina foram preparados nas concentrações 0,1 micromolar ( $\mu\text{M}$ ), 0,4  $\mu\text{M}$  e 1,6  $\mu\text{M}$ , além do controle sem tratamento. Em seguida, 50 uL de cada concentração foram distribuídos em oituplicata nas placas experimentais com os diferentes fármacos. Após a aplicação dos tratamentos, as placas foram incubadas por 24 h. Passados as 24h após aplicação dos fármacos, foi realizado o ensaio de MTT. O conteúdo dos poços foi removido e aplicado um volume de 100 uL de MTT em cada poço. Após, as placas foram incubadas em atmosfera úmida, com temperatura de 37 °C e concentração de CO<sub>2</sub> de 5% por 2h. Na sequência, o MTT foi removido e aplicado 200 uL de dimetilsulfóxido (DMSO), incubado à temperatura ambiente por 5 min e procedido a leitura em espectrofotômetro a 490 nm de absorbância. Os valores obtidos foram registrados e posteriormente realizado o cálculo da porcentagem de viabilidade celular de cada concentração: % Viabilidade Celular = Absorbância com o tóxico x 100 / Absorbância do controle.

#### 4.9 ANÁLISE *IN SILICO* DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CD73 E DESFECHOS CLÍNICOS EM CÂNCER DE BEXIGA

As análises de sobrevida foram realizadas utilizando a plataforma UCSC Xena Browser (<https://xenabrowser.net>), uma ferramenta web para exploração e integração de dados genômicos e clínicos provenientes de grandes consórcios internacionais, incluindo o *The Cancer Genome Atlas*. Foram selecionados dados de pacientes com câncer de bexiga (Bladder Urothelial Carcinoma – BLCA), incluindo informações de expressão gênica (RNA-seq) e dados clínicos associados. O gene NT5E, que codifica a ectonucleotidase CD73, foi definido como variável de interesse para as análises.

A estratificação dos pacientes foi realizada com base nos níveis de expressão gênica de NT5E, sendo os indivíduos divididos em dois grupos (alta e baixa expressão) de acordo com o valor mediano de expressão, conforme padrão da plataforma. As curvas de sobrevida foram geradas pelo método de Kaplan–Meier diretamente na plataforma, a partir da funcionalidade de análise de sobrevivência. Foram avaliados diferentes desfechos clínicos disponíveis, incluindo sobrevida global (Overall Survival – OS), intervalo livre de progressão (Progression-Free Interval – PFI) e sobrevida livre de doença (Disease-Free Survival – DFS), quando disponíveis no banco de dados.

A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste log-rank (Mantel–Cox), com cálculo automático do valor de  $p$  pela própria plataforma, sendo considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ . Os dados utilizados para a construção das curvas são obtidos em tempo real a partir dos repositórios integrados ao Xena, e os cálculos estatísticos são realizados diretamente no ambiente da ferramenta. As figuras das curvas de Kaplan–Meier foram exportadas diretamente da plataforma em formato gráfico para posterior organização e apresentação nos resultados.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.01. Para expressão gênica e viabilidade celular, outliers foram avaliados e excluídos quando apropriado, e a normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados pelo teste t não pareado (expressão gênica) ou ANOVA one-way seguida de pós-teste de Dunnett (viabilidade celular). Para dados não paramétricos, os resultados foram apresentados como mediana e intervalo de confiança. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

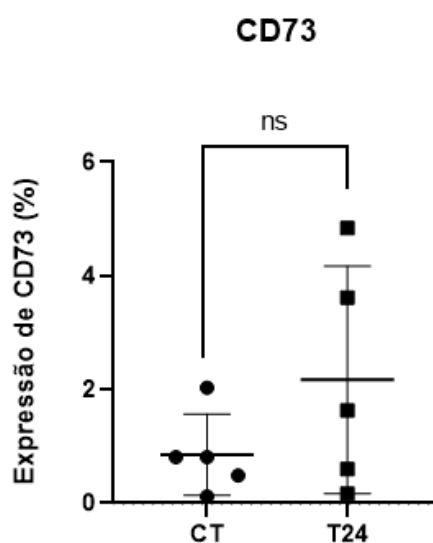
### 5.1 EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA

Não foi observada diferença na expressão de CD73 na linhagem T24 em relação ao tecido não tumoral da bexiga (tabela 1, figura 5). A linhagem T24 demonstrou a expressão da proteína CD73 por *Western Blot* e após o silenciamento por siRNA nas células da linhagem T24 e nas células CD73-KO, demonstrou-se a redução/ausência da banda de expressão de CD73, confirmando a inibição da expressão da proteína (Figura 6).

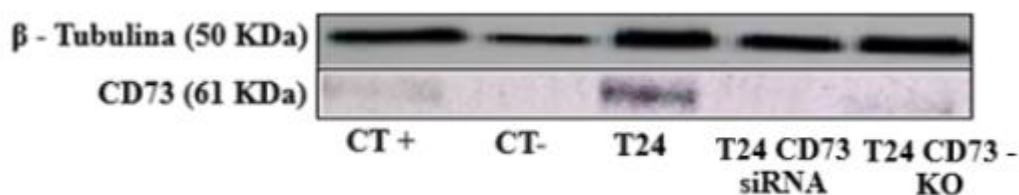
**Tabela 01** - Dados estatísticos entre amostra controle e linhagem T24

Expressão Gênica de CD73		
Amostras	Controle	T24
Média	0,85	2,17
Desvio Padrão	±0,71	± 1,99
Valor de p	p = 0,22	

**Figura 05:** Expressão Gênica de CD73



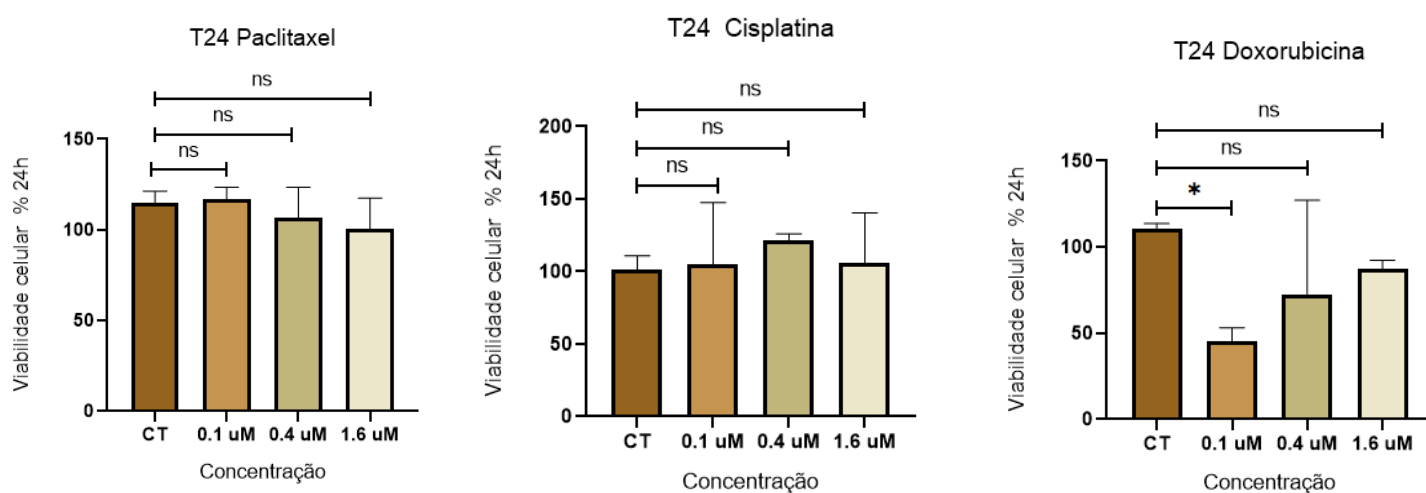
Legenda: Resultado da expressão gênica da CD73 em tecido não tumoral e linhagem tumoral T24 de câncer de bexiga. CT: Controle (tecido não tumoral da bexiga), T24: Linhagem tumoral T24 de câncer de bexiga.

**Figura 06:** Expressão proteica de CD73

Legenda: Resultado da expressão proteica por Western Blotting pós silenciamento de CD73. CT+ : Controle positivo para o silenciamento. CT - : Controle negativo para o silenciamento. T24: Linhagem T24 de câncer de bexiga não silenciado. T24 CD73 siRNA: Linhagem T24 com o RNA mensageiro de CD73 silenciado. T24 CD73 – KO: Linhagem T24 de câncer de bexiga com edição gênica de CD73 por CRISPR Cas9.

## 5.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR - MTT

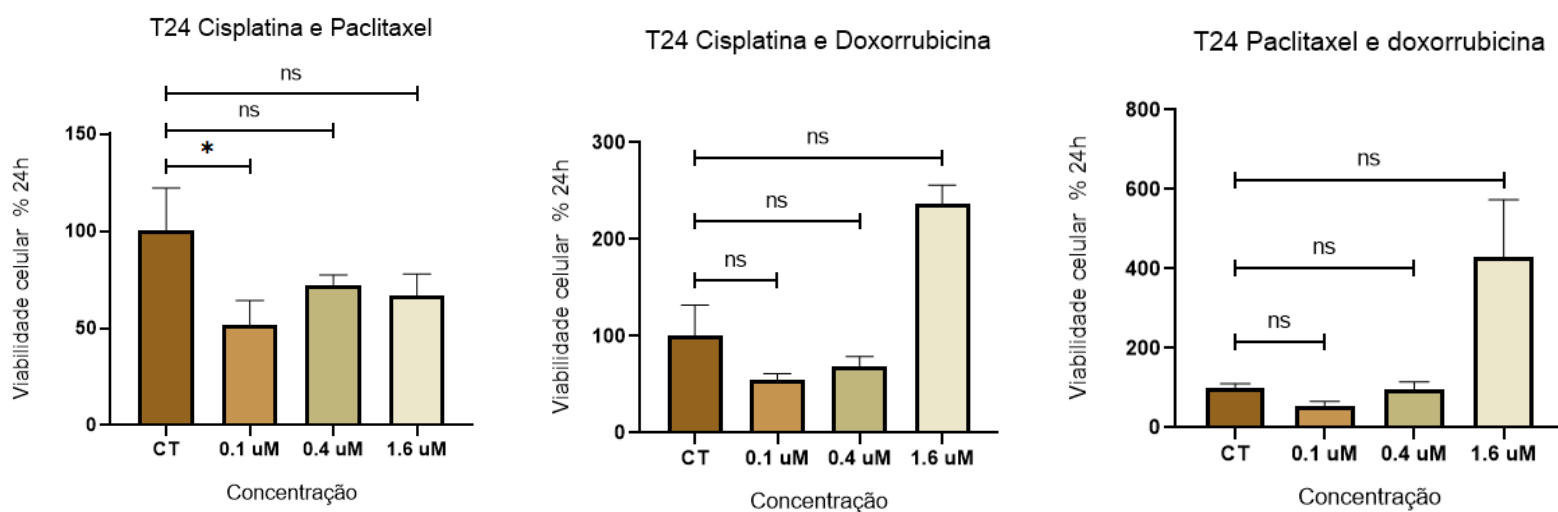
A figura 7 apresenta a linhagem T24 tratada com os quimioterápicos não associados. O tratamento com Paclitaxel e Cisplatina não demonstrou efeito na viabilidade celular, já o tratamento com Doxorrubicina na concentração de 0,1 uM induziu a redução da viabilidade celular.

**Figura 07:** Viabilidade celular após tratamento com fármacos não associados

Legenda: Resultados dos tratamentos pós aplicação de Paclitaxel, Cisplatina e Doxorrubicina não associados à linhagem T24 de câncer de bexiga.

A figura 8 apresenta a linhagem T24 tratada com os quimioterápicos associados. O tratamento com cisplatina e paclitaxel demonstrou redução da viabilidade celular na concentração de 0,1 uM, enquanto as demais concentrações não demonstraram efeito significativo. Os demais tratamentos com as combinações de cisplatina e doxorrubicina e paclitaxel e doxorrubicina não demonstraram efeito significativo na viabilidade das células T24.

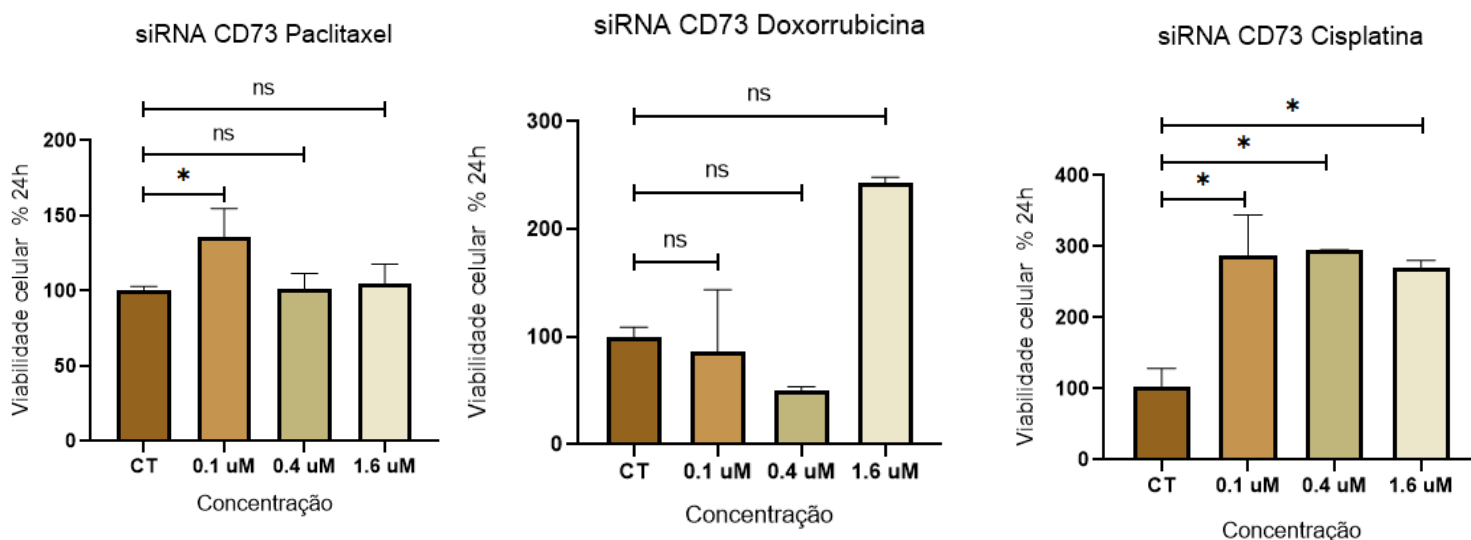
**Figura 08:** Viabilidade celular após tratamento com fármacos associados



Legenda: Resultados dos tratamentos pós aplicação dos fármacos associados – Cisplatina e Paclitaxel; Cisplatina e Doxorrubicina; Paclitaxel e doxorrubicina na linhagem T24 de câncer de bexiga.

A figura 9 apresentam a linhagem T24 tratada com os quimioterápicos não associados e pós-silenciadas com siRNA para CD73. O tratamento com paclitaxel após o silenciamento de CD73 demonstrou efeito no aumento da viabilidade celular quando aplicado a concentração de 0,1 uM. As demais concentrações não tiveram efeito significativo. Quanto ao tratamento com doxorrubicina após o silenciamento, nenhuma das concentrações gerou efeito na viabilidade celular. Para os tratamentos com cisplatina após o silenciamento de CD73, na concentração de 0,1 uM houve aumento da viabilidade celular em comparação ao controle. O mesmo se observa na concentração de 0,4 uM, onde houve um pequeno acréscimo na viabilidade das células T24. E, na concentração de 1,6 uM, embora tenha havido uma sutil redução na viabilidade das células T24, esta ainda se apresenta elevada em relação ao controle.

**Figura 09:** Viabilidade celular após silenciamento de CD73 e tratamentos com fármacos não associados

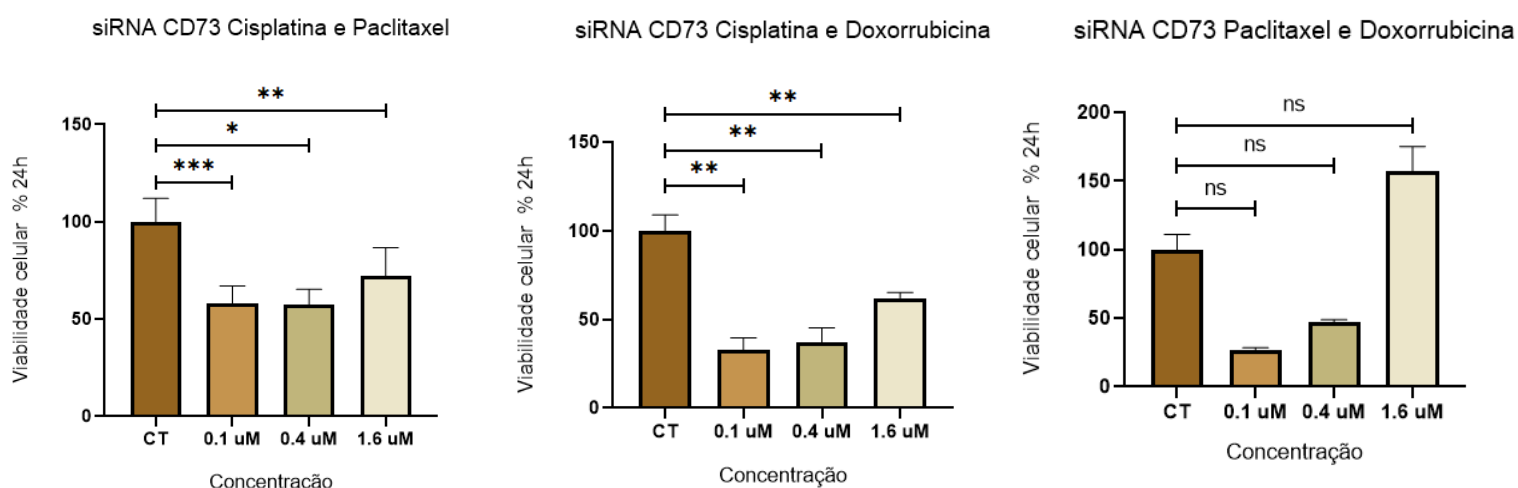


Legenda: Resultados dos tratamentos pós aplicação dos fármacos não associados – Cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel após silenciamento de CD73.

A figura 10 apresentam a linhagem T24 tratada com os quimioterápicos associados e pós-silenciadas com siRNA para CD73. O tratamento com cisplatina e paclitaxel após o silenciamento de CD73 demonstrou redução da viabilidade celular em todas as concentrações aplicadas, quando em comparação ao controle. Nota-se que na concentração de 1,6 uM, houve um pequeno aumento na viabilidade celular em comparação às primeiras concentrações, mas

em relação ao controle, a viabilidade permanece reduzida. No tratamento combinado de cisplatina e doxorrubicina, observa-se um resultado semelhante ao tratamento anterior. As concentrações de tratamento induziram redução da viabilidade celular em relação ao controle, mas na concentração de 1,6 uM a viabilidade celular apresenta-se superior às duas primeiras concentrações de tratamento. Em contrapartida, em relação ao controle, a viabilidade das células T24 ainda é reduzida. Para o tratamento combinado de paclitaxel e doxorrubicina após o silenciamento de CD73, nenhuma das concentrações de tratamento interferiu significativamente na viabilidade celular.

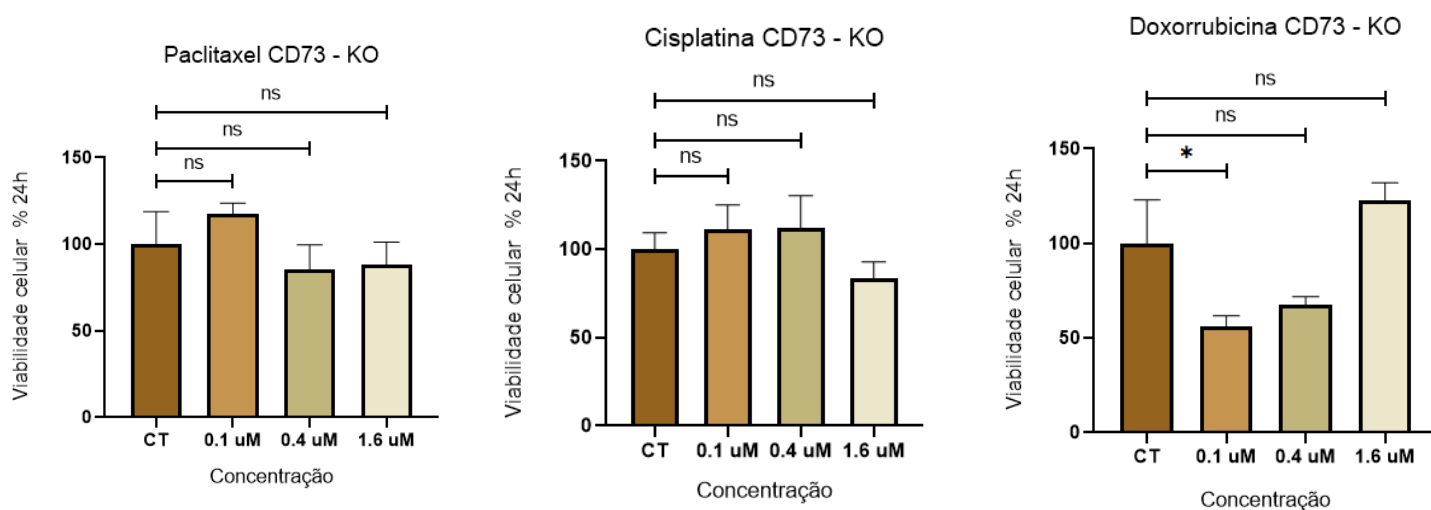
**Figura 10:** Viabilidade celular após silenciamento de CD73 e tratamentos com fármacos associados



Legenda: Resultados dos tratamentos pós aplicação dos fármacos associados –Cisplatina e paclitaxel; cisplatina e doxorrubicina; paclitaxel e doxorrubicina após silenciamento de CD73.

A figura 11 apresentam a linhagem T24 CD73 - KO tratada com os quimioterápicos não associados. O tratamento com paclitaxel não resultou em efeito significativo em nenhuma das concentrações aplicadas. O mesmo pode ser observado quando as células T24 CD73 - KO foram tratadas com cisplatina. Porém, na aplicação de doxorrubicina, a concentração de 0,1 uM resultou na redução da viabilidade em comparação ao controle.

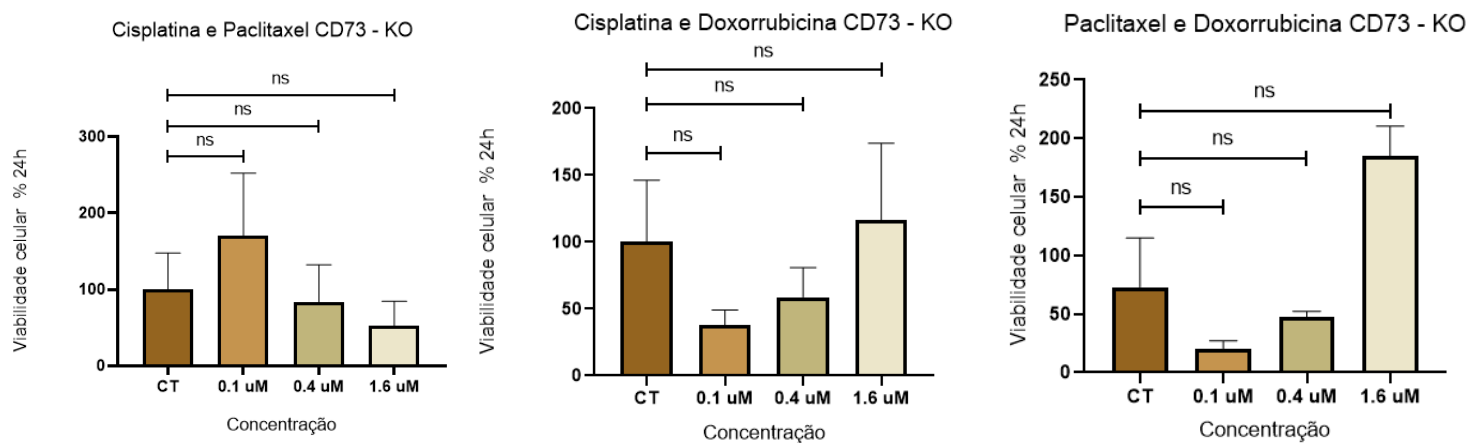
**Figura 11:** Viabilidade celular na linhagem T24 CD73 - KO e tratamentos com fármacos não associados



Legenda: Resultados dos tratamentos pós aplicação dos fármacos não associados – paclitaxel, cisplatina e doxorubicina na linhagem CD73 de câncer de bexiga após edição gênica de CD73 por CRISPR Cas9.

A figura 12 apresenta a linhagem T24 CD73 - KO tratada com os quimioterápicos associados. Nenhum dos tratamentos com os fármacos associados resultou em alterações na viabilidade das células T24 CD73 - KO.

**Figura 12:** Viabilidade celular na linhagem T24 CD73 - KO e tratamentos com fármacos associados



Legenda: Resultados dos tratamentos pós aplicação dos fármacos associados –cisplatina e paclitaxel; cisplatina e doxorubicina; paclitaxel e doxorubicina em células T24 de câncer de bexiga com edição gênica de CD73 por CRISPR Cas9.

**Tabela 02** - Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e intervalo de confiança de 95%, conforme distribuição dos dados. Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) destacados em negrito.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Tratamento</b>	<b>0,1 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,4 <math>\mu</math>M</b>	<b>1,6 <math>\mu</math>M</b>	<b>Valores de p</b>
T24	Paclitaxel	113,7	108,3	100,6	$p > 0,99 / p > 0,99 / p = 0,08$
T24	Cisplatina	117,7 $\pm$ 6,0	85,61 $\pm$ 13,95	88,34 $\pm$ 12,83	$p = 0,99 / p = 0,22 / p = 0,99$
T24	Doxorrubicina	46,86	48,59	87,79	$p = 0,04 / p = 0,16 / p = 0,82$
T24	Cisplatina + Paclitaxel	51,49 $\pm$ 12,71	72,34 $\pm$ 4,98	66,63 $\pm$ 11,32	$p = 0,01 / p = 0,13 / p = 0,05$
T24	Cisplatina + Doxorubicina	57,63	64,41	243,1	$p = 0,51 / p > 0,99 / p = 0,30$
T24	Paclitaxel + Doxorubicina	47,04	101,3	460,0	$p = 0,30 / p > 0,99 / p = 0,30$
Pós-siRNA CD73	Paclitaxel	136,0 $\pm$ 18,70	101,3 $\pm$ 10,22	105,1 $\pm$ 12,61	$p = 0,04 / p = 0,98 / p = 0,63$
Pós-siRNA CD73	Doxorrubicina	46,86	48,59	87,79	$p = 0,04 / p = 0,16 / p = 0,82$
Pós-siRNA CD73	Cisplatina	287,8 $\pm$ 56,45	295,0 $\pm$ 0,21	270,4 $\pm$ 9,81	$p = 0,04 / p = 0,01 / p = 0,02$
Pós-siRNA CD73	Cisplatina + Paclitaxel	58,26 $\pm$ 8,81	57,19 $\pm$ 8,15	71,94 $\pm$ 4,76	$p = 0,01 / p = 0,002 / p = 0,002$
Pós-siRNA CD73	Cisplatina + Doxorubicina	32,60 $\pm$ 7,03	37,18 $\pm$ 8,12	62,09 $\pm$ 3,20	$p = 0,002 / p = 0,006 / p = 0,002$
Pós-siRNA CD73	Paclitaxel + Doxorubicina	27,46	46,77	161,6	$p = 0,08 / p = 0,08 / p = 0,08$
CD73-KO	Paclitaxel	105,1 $\pm$ 42,37	121,6 $\pm$ 4,52	105,7 $\pm$ 34,79	$p = 0,24 / p = 0,61 / p = 0,70$
CD73-KO	Cisplatina	41,04	65,89	210,8	$p = 0,42 / p = 0,70 / p = 0,13$
CD73-KO	Doxorrubicina	54,95	65,75	119,0	$p = 0,04 / p = 0,51 / p > 0,99$
CD73-KO	Cisplatina + Paclitaxel	203,0	93,89	39,36	$p > 0,99 / p > 0,99 / p = 0,82$
CD73-KO	Cisplatina + Doxorubicina	37,71 $\pm$ 11,50	58,83 $\pm$ 22,05	116,1 $\pm$ 57,75	$p = 0,15 / p = 0,53 / p = 0,68$
CD73-KO	Paclitaxel + Doxorubicina	20,38 $\pm$ 6,87	47,62 $\pm$ 4,75	185,0 $\pm$ 25,45	$p = 0,36 / p = 0,70 / p = 0,09$

### 5.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA DE PACIENTES

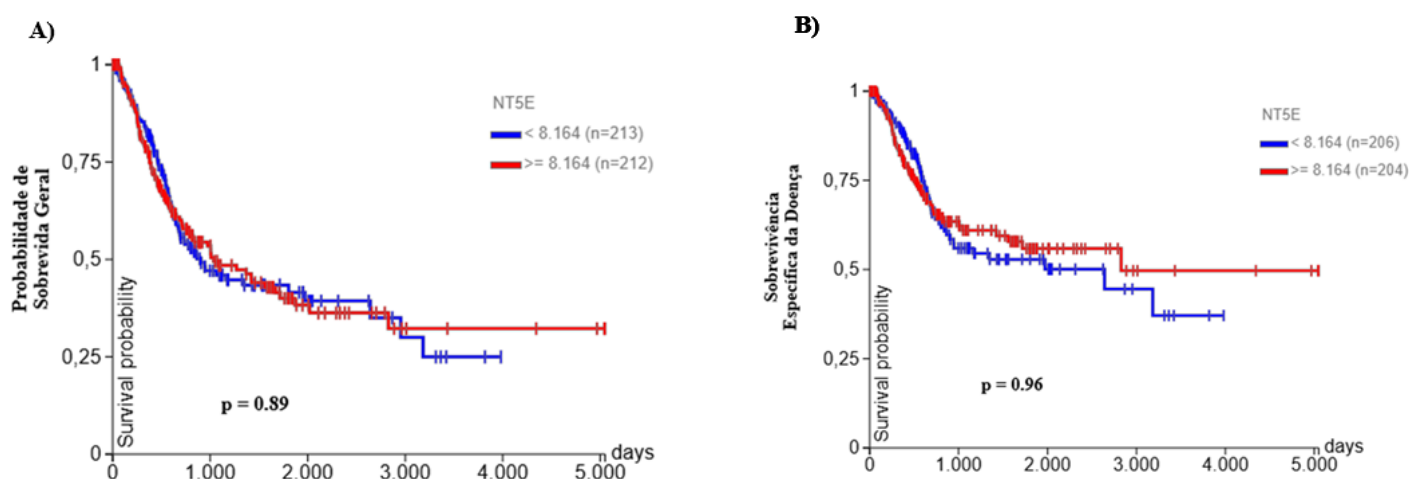
A análise de sobrevida baseada na expressão do gene CD73 em pacientes com câncer de bexiga não demonstrou associação estatisticamente significativa com os desfechos clínicos avaliados. Painel A - Sobrevida Global: A análise de sobrevida global não evidenciou diferença significativa entre os grupos com alta e baixa expressão de NT5E. As curvas de Kaplan–Meier mostram comportamento semelhante ao longo do tempo, com sobreposição entre os grupos, corroborado pelo teste de log-rank ( $p = 0,89$ ). Esses achados indicam que a expressão de CD73 não está associada à sobrevida global nesta coorte.

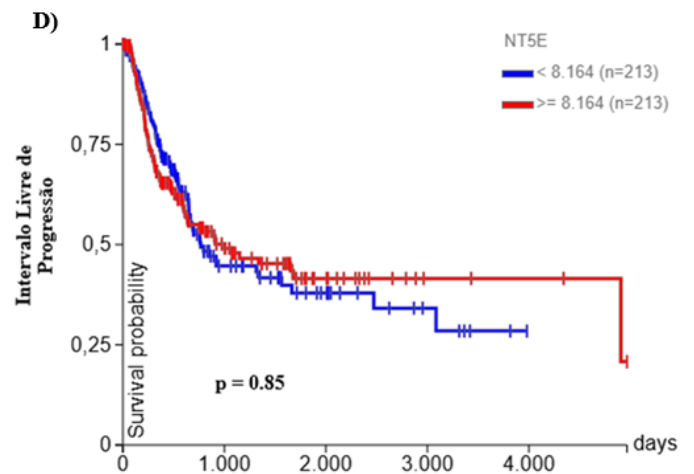
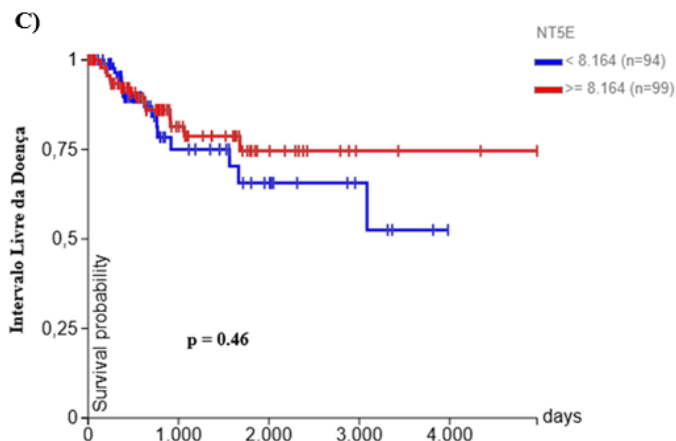
Painel B - Sobrevida Específica da Doença: Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estratificados pela expressão de NT5E ( $p = 0,96$ ). As curvas apresentam padrão semelhante, sugerindo que a expressão do gene não influencia diretamente a mortalidade atribuída ao câncer de bexiga.

Painel C - Intervalo Livre de Doença: Não foram identificadas diferenças significativas entre pacientes com alta e baixa expressão de NT5E ( $p = 0,46$ ). Apesar de uma tendência visual de maior intervalo livre de doença no grupo com maior expressão, essa diferença não alcançou significância estatística.

Painel D - Intervalo Livre de Progressão: Também não demonstrou associação significativa com a expressão de NT5E ( $p = 0,85$ ). As curvas de Kaplan–Meier indicam comportamento semelhante entre os grupos ao longo do tempo, sugerindo que a expressão de CD73 não impacta a progressão da doença nesta população.

**Figura 13:** Curvas de Kaplan–Meier para desfechos clínicos em câncer de bexiga de acordo com a expressão do gene CD73





Legenda: Resultados da Análise de associação da expressão de CD73 com desfechos clínicos de pacientes acometidos com câncer de bexiga. A) Expressão de CD73 relacionado à probabilidade de sobrevida geral. B) Expressão de CD73 relacionado à sobrevivência específica da doença. C) Expressão de CD73 relacionado ao intervalo livre de doença. D) Expressão de CD73 relacionado ao intervalo livre de progressão.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o papel da ectonucleotidase CD73 como moduladora da resposta a quimioterápicos na linhagem de câncer de bexiga T24, considerando diferentes abordagens experimentais: células não modificadas, silenciamento gênico por siRNA e knockout gênico por CRISPR/Cas9. De forma geral, os resultados demonstram que a modulação de CD73 impacta a resposta celular aos fármacos, de maneira dependente do contexto experimental e da estratégia de inibição adotada.

Inicialmente, a análise de expressão gênica não evidenciou aumento significativo de CD73 na linhagem tumoral T24 em relação ao tecido não tumoral. Esse achado diverge de estudos que relatam superexpressão de CD73 em tumores sólidos, incluindo câncer de bexiga (Jiang et al., 2018; Yang et al., 2021; Tang et al., 2022). No entanto, essa discrepância pode ser explicada pela heterogeneidade tumoral e pelos mecanismos regulatórios pós-transcricionais que modulam a expressão de CD73 (Bach et al., 2023). De fato, a análise proteica confirmou a presença da enzima e demonstrou redução após o silenciamento por siRNA, indicando que a modulação funcional da CD73 foi eficaz, mesmo na ausência de diferenças significativas no nível de mRNA.

Nos ensaios de viabilidade celular, a linhagem T24 não modificada apresentou baixa sensibilidade aos quimioterápicos quando administrados isoladamente, com exceção da doxorrubicina em baixa concentração. Esse perfil sugere resistência basal, possivelmente associada a mecanismos como ativação de vias de sobrevivência celular, aumento do efluxo de fármacos e alterações metabólicas (Packer et al., 2023; Li et al., 2022). No câncer de bexiga, a resistência à cisplatina e outros quimioterápicos é amplamente descrita, sendo relacionada a alterações em vias como PI3K/AKT, reparo de DNA e evasão apoptótica (Alifrangis et al., 2019; Xie et al., 2024).

Quando os fármacos foram utilizados em associação na linhagem T24, observou-se efeito citotóxico limitado, indicando ausência de sinergismo relevante nas condições testadas. Esse resultado está em consonância com estudos que demonstram que a eficácia de terapias combinadas depende de fatores moleculares específicos do tumor, incluindo o estado da sinalização purinérgica e a presença de mecanismos de resistência intrínseca (Di Virgilio et al., 2018; Campos-Contreras et al., 2020).

Após o silenciamento de CD73 por siRNA, observou-se alteração significativa no perfil de resposta celular. A aplicação isolada de cisplatina e paclitaxel resultou, em algumas condições, em aumento da viabilidade celular, sugerindo um possível mecanismo

compensatório. Esse efeito pode estar relacionado à redução da produção de adenosina extracelular (ADO), que, embora associada à imunossupressão, também participa da regulação de vias intracelulares de estresse e sobrevivência celular, ativando receptores P1 que favorecem a sobrevivência celular e reduzem respostas inflamatórias e de estresse, contribuindo para a adaptação tumoral (Boison & Yegutkin, 2019; Bach et al., 2023).

Por outro lado, quando os quimioterápicos foram administrados em combinação após o silenciamento de CD73, observou-se redução significativa da viabilidade celular, especialmente nas associações cisplatina + paclitaxel e cisplatina + doxorrubicina. Esse achado sugere que a inibição de CD73 pode sensibilizar células tumorais a terapias combinadas, possivelmente por interferir na geração de adenosina e reduzir sinais pró-tumorais no microambiente estimulando vias que favorecem proliferação, sobrevivência celular e escape imunológico tumoral, de modo que sua redução pode aumentar a sensibilidade aos quimioterápicos (Boison & Yegutkin, 2019; Bach et al., 2023). Evidências no câncer de bexiga indicam que a expressão de CD73 está associada à progressão tumoral, imunossupressão e pior prognóstico, sendo sua inibição capaz de reduzir a proliferação celular e modular a resposta terapêutica (Zhou et al., 2017; Yu et al., 2020; Allard et al., 2019).

De forma interessante, os resultados obtidos na linhagem T24 CD73 knockout não reproduziram completamente os achados observados com o silenciamento por siRNA. Nessa linhagem, tanto os tratamentos isolados quanto os combinados não resultaram em reduções consistentes da viabilidade celular. Essa diferença pode ser explicada por mecanismos adaptativos decorrentes da deleção permanente do gene, levando à reprogramação celular e ativação de vias compensatórias que mantêm a sobrevivência celular, tal como à ativação compensatória de vias antiapoptóticas e de metabolismo energético, como PI3K/AKT e aumento da glicólise (Mantwill et al., 2023).

Essa discrepância reforça que a resposta celular à modulação de CD73 depende não apenas da sua ausência, mas da forma como essa modulação ocorre. O silenciamento transitório pode induzir um estado de vulnerabilidade celular, enquanto o knockout permanente pode favorecer adaptação fenotípica. Esse aspecto é altamente relevante, considerando que estratégias terapêuticas clínicas geralmente envolvem inibição farmacológica transitória, mais próxima do modelo de siRNA do que do knockout gênico.

Além disso, considerando o papel central da CD73 na conversão de AMP em adenosina, os efeitos observados podem estar diretamente relacionados à modulação da sinalização purinérgica no microambiente tumoral. A adenosina atua como um potente mediador imunossupressor e promotor de progressão tumoral, influenciando proliferação, angiogênese e

resistência terapêutica (Di Virgilio et al., 2018; Boison & Yegutkin, 2019; Bach et al., 2023). No câncer de bexiga, essa via tem sido associada à evasão da resposta imune e ao aumento da agressividade tumoral (Zhou et al., 2017; Wilkat et al., 2020).

Por fim, é importante destacar que o modelo experimental utilizado é limitado à análise *in vitro*, não contemplando a interação com o sistema imune, que desempenha papel fundamental nos efeitos da adenosina no microambiente tumoral. Dessa forma, os resultados refletem predominantemente mecanismos intrínsecos das células tumorais, o que deve ser considerado na interpretação dos dados.

Em conjunto, os achados deste estudo indicam que a CD73 exerce papel relevante na modulação da resposta a quimioterápicos no câncer de bexiga, especialmente em contextos de terapia combinada. Sua inibição, particularmente por abordagens transitórias, pode aumentar a sensibilidade celular, enquanto a ausência permanente pode desencadear mecanismos compensatórios. Assim, a CD73 se destaca como um potencial biomarcador e alvo terapêutico, embora estudos adicionais sejam necessários para compreender plenamente seu papel em diferentes contextos biológicos e terapêuticos.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a ectonucleotidase CD73 desempenha papel relevante na modulação da resposta a quimioterápicos na linhagem de câncer de bexiga T24, sendo sua influência dependente da forma de inibição e do contexto experimental. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na expressão gênica, a redução da expressão proteica após o silenciamento por siRNA confirmou a modulação efetiva de CD73. A linhagem T24 apresentou baixa sensibilidade aos quimioterápicos em condições basais, sugerindo um perfil de resistência intrínseca.

A inibição transitória de CD73 alterou significativamente a resposta celular, destacando-se a redução da viabilidade em tratamentos combinados, especialmente aqueles envolvendo cisplatina. Em contraste, a deleção permanente do gene não reproduziu esse efeito, sugerindo a ativação de mecanismos compensatórios celulares. Em conjunto, os achados posicionam a CD73 como um modulador da sensibilidade a quimioterápicos e reforçam seu potencial como biomarcador e alvo terapêutico no câncer de bexiga, particularmente em estratégias de terapia combinada.

Esses resultados ampliam a compreensão dos mecanismos de resistência tumoral e destacam a sinalização purinérgica como um eixo promissor para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes.

## 8 REFERÊNCIAS

Allard, D.; Chrobak, P.; Allard, B.; Messaoudi, N.; Stagg, J. Targeting the CD73-Adenosine Axis in Immuno-Oncology. *Immunol. Lett.* 2019, 205, 31–39.

Alifrangis C, McGovern U, Freeman A, Powles T, Linch M. Molecular and histopathology directed therapy for advanced bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2019;16:465–83.

Bach N, Winzer R, Tolosa E, Fiedler W, Brauneck F. The Clinical Significance of CD73 in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 21;24(14):11759. doi: 10.3390/ijms241411759. PMID: 37511518; PMCID: PMC10380759.

Boison, D., & Yegutkin, G. G. (2019). Adenosine metabolism: Emerging concepts for cancer therapy. *Cancer Cell* 36,582–596

Bjurlin MA, Matulewicz RS, editors. *Comprehensive diagnostic approach to bladder cancer: molecular imaging and biomarkers. C* ham, Switzerland: Springer International Publishing; 2021. 10.1007/978-3-030-82048-0

Calik, I.; Calik, M.; Turken, G.; Ozercan, I.H. A promising independent prognostic biomarker in colorectal cancer: P2X7 receptor. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2020, 13, 107–121.

Campos-Contreras ADR, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells.* 2020 Jul 3;9(7):1612. doi: 10.3390/cells9071612. PMID: 32635260; PMCID: PMC7407645.

David D, Abufaraj M, Susani M, Ristl R, Foerster B, Kimura S, Mari A, Soria F, Briganti A, Karakiewicz PI. Accurate prediction of progression to muscle-invasive disease in patients with pT1G3 bladder cancer: a clinical decision-making tool. *Urol Oncol.* 2018;36:239.e1-239.e7.

Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E., and Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 18, 601–618. doi:10.1038/S41568-018-0037-0

Dobruch J, Oszczudłowski M. Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Jul 24;57(8):749. doi: 10.3390/medicina57080749. PMID: 34440955; PMCID: PMC8402079.

Faraoni, E.Y.; Singh, K.; Chandra, V.; Le Roux, O.; Dai, Y.; Sahin, I.; O'Brien, B.J.; Strickland, L.N.; Li, L.; Vucic, E.; et al. CD73 Dependent Adenosine Signaling through Adora2b Drives Immunosuppression in Ductal Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 2023, 83, 1111–1127.

Farooqi A, Khalid S, Ahmad A. Regulation of cell signaling pathways and miRNAs by resveratrol in different cancers. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):652.

Flaig TW, Spiess PE, Agarwal N, et al. Bladder cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020;18(3):329-354.

Gandhi J, Chen JF, Al-Ahmadie H. Urothelial Carcinoma: Divergent Differentiation and Morphologic Subtypes. *Surg Pathol Clin*. 2022 Dec;15(4):641-659. doi: 10.1016/j.path.2022.07.003. Epub 2022 Oct 13. PMID: 36344181; PMCID: PMC9756812.

Ghalamfarsa, G.; Kazemi, M.H.; Raoofi Mohseni, S.; Masjedi, A.; Hojjat-Farsangi, M.; Azizi, G.; Yousefi, M.; Jadidi-Niaragh, F. CD73 as a Potential Opportunity for Cancer Immunotherapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 2019, 23, 127–142.

Hernández-Prat A, Rodríguez-Vida A, Juanpere-Rodero N, Arpi O, Menéndez S, Soria-Jiménez L, Martínez A, Iarchouk N, Rojo F, Albanell J. Novel oral mTORC1/2 inhibitor TAK-228 has synergistic antitumor effects when combined with paclitaxel or PI3K $\alpha$  inhibitor TAK-117 in preclinical bladder cancer models. *Mol Cancer Res*. 2019;17(9):1931–44

Hinkle JL, Cheever KH, Overbaugh KJ, eds. Management of patients with urinary disorders: bladder cancer and urinary diversion (Chapter 49). In: *Brunner and Suddarth's Textbook of Medical-Surgical Nursing*. 15th ed. Wolters Kluwer; 2022:1626-1637.

<https://www.biorender.com/>

<https://xenabrowser.net/heatmap/>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Detecção precoce do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/deteccaoprecoce-do-cancer>

Jacoberger-Foissac, C.; Cousineau, I.; Bareche, Y.; Allard, D.; Chrobak, P.; Allard, B.; Pommey, S.; Messaoudi, N.; McNicoll, Y.; Soucy, G.; et al. CD73 Inhibits CGAS-STING and Cooperates with CD39 to Promote Pancreatic Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2023, 11, 56–71.

Jeong, Y.M.; Cho, H.; Kim, T.M.; Kim, Y.; Jeon, S.; Bychkov, A.; Jung, C.K. CD73 Overexpression Promotes Progression and Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancers* 2020, 12, 3042

Jiang, T.; Xu, X.; Qiao, M.; Li, X.; Zhao, C.; Zhou, F.; Gao, G.; Wu, F.; Chen, X.; Su, C.; et al. Comprehensive Evaluation of NT5E/CD73 Expression and Its Prognostic Significance in Distinct Types of Cancers. *BMC Cancer* 2018, 18, 267.

Jubber I, Ong S, Bukavina L, et al. Epidemiology of bladder cancer in 2023: a systematic review of risk factors. *Eur Urol.* 2023;84(2):176-190.

Kardoust Parizi M, Enikeev D, Glybochko PV, et al. Prognostic value of T1 substaging on oncological outcomes in patients with non-muscle-invasive bladder urothelial carcinoma: a systematic literature review and meta-analysis. *World J Urol* 2019 Sep 6 [Epub ahead of print]

Khan K, Quispe C, Javed Z, Iqbal MJ, Sadia H, Raza S, Irshad A, Salehi B, Reiner Ž, Sharifi-Rad J. Resveratrol, curcumin, paclitaxel and miRNAs mediated regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway: go four better to treat bladder cancer. *Cancer Cell Int.* 2020 Nov 23;20(1):560. doi: 10.1186/s12935-020-01660-7. PMID: 33292283; PMCID: PMC7685642.

Kim KH, Phan DTT, Ha HK, Jung EH, Song G, Seo HK. Treatment strategies for cisplatin-ineligible metastatic bladder cancer: Emerging therapies and future perspectives. *Investig Clin*

Urol. 2025 Nov;66(6):471-481. doi: 10.4111/icu.20250316. PMID: 41184140; PMCID: PMC12599474.

Koivisto MK, Tervahartiala M, Kenessey I, Jalkanen S, Boström PJ, Salmi M. Cell-type-specific CD73 expression is an independent prognostic factor in bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2019 Mar 12;40(1):84-92. doi: 10.1093/carcin/bgy154. PMID: 30395172.

Kordaß, T.; Osen, W.; Eichmüller, S.B. Controlling the Immune Suppressor: Transcription Factors and MicroRNAs Regulating CD73/NT5E. *Front. Immunol.* 2018, 9, 813.

Labrie, M., Brugge, J. S., Mills, G. B., and Zervantonakis, I. K. (2022). Therapy resistance: Opportunities created by adaptive responses to targeted therapies in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 22, 323–339. doi:10.1038/S41568-022 00454-5

Lee, J. W.; Ko, J.; Ju, C.; Eltzschig, H. K. Hypoxia Signaling in Human Diseases and Therapeutic Targets. *Exp. Mol. Med.* 2019, 51, 1–13.

Linden, J., Koch-Nolte, F., and Dahl, G. (2019). Purine release, metabolism, and signaling in the inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 325–347. doi:10. 1146/ANNUREV IMMUNOL-051116-052406

Li, H.; Xie, P.; Li, P.; Du, Y.; Zhu, J.; Yuan, Y.; Wu, C.; Shi, Y.; Huang, Z.; Wang, X.; et al. CD73/NT5E Is a Potential Biomarker for Cancer Prognosis and Immunotherapy for Multiple Types of Cancers. *Adv. Biol.* 2022, 7, 2200263

Liu, H.; Yuan, M.; Yao, Y.; Wu, D.; Dong, S.; Tong, X. In Vitro effect of Pannexin 1 channel on the invasion and migration of I-10 testicular cancer cells via ERK1/2 signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* 2019, 117, 109090. Marine, J. C., Dawson, S. J., and Dawson, M. A. (2020). Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 20, 743–756. doi:10.1038/ S41568-020 00302-4

Li Z, Ren D, Chen C, Sun L, Fang K. OSU-T315 and doxorubicin synergistically induce apoptosis via mitochondrial pathway in bladder cancer cells. *Cell Biology International.* 2022; 46: 1672–1681.

Lu, T.; Zhang, Z.; Zhang, J.; Pan, X.; Zhu, X.; Wang, X.; Li, Z.; Ruan, M.; Li, H.; Chen, W.; et al. CD73 in Small Extracellular Vesicles Derived from HNSCC Defines Tumour-Associated Immunosuppression Mediated by Macrophages in the Microenvironment. *J. Extracell. Vesicles* 2022, 11, e12218

Ma, D.F.; Kondo, T.; Nakazawa, T.; Niu, D.F.; Mochizuki, K.; Kawasaki, T.; Yamane, T.; Katoh, R. Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells. *Hum. Pathol.* 2018, 41, 1550–1557.

Mantwill K, Nawroth R. Genome-Wide CRISPR Screening for the Identification of Therapy Resistance-Associated Genes in Urothelial Carcinoma. *Methods Mol Biol.* 2023;2684:155-165. doi: 10.1007/978-1-0716-3291-8\_9. PMID: 37410233.

Meeks JJ. Bladder cancer screening, signs, symptoms, and work-up. In: Kamat AM, Black PC, eds. *Bladder Cancer: A Practical Guide*. Springer; 2021:25-40.

Minor, M.; Alcedo, K.P.; Battaglia, R.A.; Snider, N.T. Cell Type- and Tissue-Specific Functions of Ecto-5-Nucleotidase (CD73). *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2019, 317, C1079–C1092.

Mossanen M. The epidemiology of bladder cancer. In: Sonpavde GP, ed. *Hematology/Oncology Clinics of North America: Bladder Cancer*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2021:445-455.

Packeiser EM, Engels L, Nolte I, Goericke-Pesch S, Murua Escobar H. MDR1 Inhibition Reverses Doxorubicin-Resistance in Six Doxorubicin-Resistant Canine Prostate and Bladder Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2023 May 2;24(9):8136. doi: 10.3390/ijms24098136. PMID: 37175843; PMCID: PMC10179448.

Rockenbach L, Bavaresco L, Fernandes Farias P, Cappellari AR, Barrios CH, Bueno Morrone F, Oliveira Battastini AM. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. *Urol Oncol.* 2013 Oct;31(7):1204-11. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.10.009. Epub 2011 Dec 3. PMID: 22137869.

Rockenbach L, Braganhol E, Dietrich F, Figueiró F, Pugliese M, Edelweiss MI, Morrone FB, Sévigny J, Battastini AM. NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. *Purinergic Signal*. 2014 Sep;10(3):421-30. doi: 10.1007/s11302-014-9405-8. Epub 2014 Jan 26. PMID: 24464643; PMCID: PMC4152458.

Rutz J, Janicova A, Woidacki K, Chun FKH, Blaheta RA, Relja B. Curcumin—a viable agent for better bladder cancer treatment. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3761.

Sahabi, K.; Selvarajah, G.T.; Mokrish, A.; Rasedee, A.; Kqueen, C.Y. Development and molecular characterization of doxorubicin resistant canine mammary gland tumour cells. *J. Appl. Anim. Res.* 2022, 50, 125–145.

Sharifi-Rad J, Quispe C, Patra JK, Singh YD, Panda MK, Das G, Adetunji CO, Michael OS, Sytar O, Polito L, Zivkovic J, Cruz-Martins N, Klimek-Szczykutowicz M, Ekiert H, Choudhary MI, Ayatollahi SA, Tynybekov B, Kobarfard F, Muntean AC, Grozea I, Dastan SD, Butnariu M, Szopa A and Calina D. Paclitaxel: application in modern oncology and nanomedicine-based cancer therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 3687700.

Sidders, B.; Zhang, P.; Goodwin, K.; O'Connor, G.; Russell, D.L.; Borodovsky, A.; Armenia, J.; McEwen, R.; Linghu, B.; Bendell, J.C.; et al. Adenosine Signaling Is Prognostic for Cancer Outcome and Has Predictive Utility for Immunotherapeutic Response. *Clin. Cancer Res.* 2020, 26, 2176–2187.

Sridhar SS, Blais N, Tran B, Reaume MN, North SA, Stockler MR, Chi KN, Fleshner NE, Liu G, Robinson JW, Mukherjee SD, Rahim Y, Winquist E, Booth CM, Nguyen NT, Beardsley EK, Alimohamed NS, McDonald GT, Ding K and Paulekar WR. Efficacy and safety of nab-paclitaxel vs paclitaxel on survival in patients with platinum-refractory metastatic urothelial cancer: the canadian cancer trials group BL12 randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2020; 6: 1751-1758.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., et al. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca. Cancer J. Clin.* 71, 209–249. doi:10.3322/CAAC.21660

Tang, K.; Zhang, J.; Cao, H.; Xiao, G.; Wang, Z.; Zhang, X.; Zhang, N.; Wu, W.; Zhang, H.; Wang, Q.; et al. Identification of CD73 as a Novel Biomarker Encompassing the Tumor Microenvironment, Prognosis, and Therapeutic Responses in Various Cancers. *Cancers* 2022, 14, 5663.

Wang, M.; Jia, J.; Cui, Y.; Peng, Y.; Jiang, Y. CD73-Positive Extracellular Vesicles Promote Glioblastoma Immunosuppression by Inhibiting T-Cell Clonal Expansion. *Cell Death Dis.* 2021, 12, 1065.

Wettstein MS, Buser L, Hermanns T, Roudnicky F, Eberli D, Baumeister P, Sulser T, Wild P, Poyet C. CD73 Predicts Favorable Prognosis in Patients with Nonmuscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer. *Dis Markers.* 2015;2015:785461. doi: 10.1155/2015/785461. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26543299; PMCID: PMC4620269.

Wilkat, M.; Bast, H.; Drees, R.; Dünser, J.; Mahr, A.; Azoitei, N.; Marienfeld, R.; Frank, F.; Brhel, M.; Ushmorov, A.; et al. Adenosine receptor 2B activity promotes autonomous growth, migration as well as vascularization of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 2020, 147, 202–217.

World Cancer Research Fund International. Bladder Cancer Statistics. [www.wcrf.org/cancer-trends/bladder-cancer-statistics/](http://www.wcrf.org/cancer-trends/bladder-cancer-statistics/).

Xie M, Zhou L, Li T, Lin Y, Zhang R, Zheng X, Zeng C, Zheng L, Zhong L, Huang X, Zou Y, Kang T, Wu Y. Targeting the KAT8/YEATS4 Axis Represses Tumor Growth and Increases Cisplatin Sensitivity in Bladder Cancer. *Adv Sci (Weinh).* 2024 Jun;11(22):e2310146. doi: 10.1002/advs.202310146. Epub 2024 Mar 25. Erratum in: *Adv Sci (Weinh).* 2025 Sep;12(34):e13864. doi: 10.1002/advs.202513864. PMID: 38526153; PMCID: PMC11165526.

Yadav, U. P., Singh, T., Kumar, P., Sharma, P., Kaur, H., Sharma, S., et al. (2020). Metabolic adaptations in cancer stem cells. *Front. Oncol.* 10, 1010. doi:10.3389/FONC.2020.01010

Yang,H.;Yao,F.; Davis, P.F.; Tan, S.T.; Hall, S.R.R. CD73, Tumor Plasticity and Immune Evasion in Solid Cancers. *Cancers* 2021, 13, 177.

Yu DL, Lou ZP, Ma FY and Najafi M. The interactions of paclitaxel with tumour microenvironment. *Int Immunopharmacol* 2022; 105: 108555.

Yu, M.; Guo, G.; Huang, L.; Deng, L.; Chang, C.S.; Achyut, B.R.; Canning, M.; Xu, N.; Arbab, A.S.; Bollag, R.J.; et al. CD73 on Cancer-Associated Fibroblasts Enhanced by the A2B-Mediated Feedforward Circuit Enforces an Immune Checkpoint. *Nat. Commun.* 2020, 11, 515.

Zanoni, M., Bravaccini, S., Fabbri, F., and Arienti, C. (2022a). Emerging roles of aldehyde dehydrogenase isoforms in anti-cancer therapy resistance. *Front. Med.* 9, 795762. doi:10.3389/FMED.2022.795762

Zhou,Y.; Chu, X.; Deng, F.; Tong, L.; Tong, G.; Yi, Y.; Liu, J.; Tang, J.; Tang, Y.; Xia, Y.; et al. The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. *Oncotarget* 2017, 8, 48755–48768.

