

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

**ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA
CISTITE HEMORRÁGICA E DO CÂNCER DE BEXIGA**

FABRÍCIA DIETRICH

Porto Alegre

2016

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

**ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA
CISTITE HEMORRÁGICA E DO CÂNCER DE BEXIGA**

FABRÍCIA DIETRICH

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

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

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Dietrich , Fabrícia

Envolvimento da sinalização purinérgica em estratégias terapêuticas para o tratamento da cistite hemorrágica e do câncer de bexiga / Fabrícia Dietrich . -- 2016.

200 f.

Orientadora: Ana Maria Oliveira Battastini.

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

1. Receptores purinérgicos. 2. Ectonucleotidases. 3. Câncer de bexiga. 4. Cistite hemorrágica. 5. Bexiga urinária. I. Battastini, Ana Maria Oliveira, orient. II. Título.

**À minha amada família:
pai Lírio, mãe Soeli, mana Franciele e namorado Fernando.**

*“A descoberta consiste em ver o que todo mundo já viu e pensar o que ninguém
pensou.”*

Alber Szent-György
Prêmio Nobel em Medicina 1937

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela grandiosa contribuição na minha formação acadêmica. A CAPES e ao CNPq pela bolsa concedida. Muito obrigada!

De forma especial agradeço à minha orientadora Ana Maria Oliveira Battastini, por ter aberto as portas do seu laboratório e assim ter me concedido a oportunidade de crescimento pessoal, científico e profissional. Muito obrigada pelos constantes ensinamentos, pela competência, pela honestidade e pelo exemplo de profissional ética que és!

Agradecimento especial à professora Fernanda Bueno Morrone pela colaboração de tantos anos! Obrigada pela oportunidade de desenvolver todo o projeto cistite em seu laboratório e pela contribuição fundamental no projeto radioterapia.

À professora Maria Martha Campos, pelo incentivo e envolvimento no desenvolvimento do projeto cistite.

Ao professor George Gonzáles Ortega e ao colega Samuel Kaiser, pela competência e pela responsabilidade com que realizaram a obtenção da fração purificada de *Uncaria tomentosa*.

À professora Christa E. Müller pela oportunidade de estagiar em seu laboratório. Obrigada a Marianne Freundlieb, pelos ricos ensinamentos e pela recepção amiga!

Um agradecimento especial ao Jerônimo Pietrobon Martins, que sempre muito prestativo esteve presente em todos os passos dos experimentos *in vivo* auxiliando na concretização do projeto cistite. À Angélica Regina Cappellari, que teve papel fundamental a partir do segundo ano do meu doutorado, mas que se manteve presente, mesmo de longe, acompanhando o andamento do projeto. Agradeço a ela,

principalmente, pelas palavras amigas e de conforto quando nos momentos em que nada parecia dar certo e que nada fazia sentido, ela estava ali para me lembrar do quão importante era o meu trabalho! Ao Fabrício Figueiró, que a partir do terceiro ano esteve muito presente, me acompanhando diariamente nos experimentos, trocando e discutindo ideias. Ao Eduardo Cremonese Filippi-Chiela, que no último ano acabou se envolvendo e trazendo contribuições importantíssimas ao trabalho. Obrigada a todos vocês pela disposição na discussão de ideias, pelo envolvimento, pela ajuda, pela motivação e pela amizade! Fico feliz por ter encontrado pessoas tão competentes quanto vocês!

Carinhosamente quero agradecer à Patrícia Boni de Paula, a querida bolsista Pati! Obrigada pelo trabalho sério e comprometido enquanto estivestes comigo! Obrigada pela tua dedicação e ajuda!

À Liliana Rockenbach, por juntas compartilharmos tantos momentos alegres e difíceis do doutorado. Obrigada por ser esta colega e amiga tão presente e prestativa!

Aos queridos amigos do laboratório 22, obrigada pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pelos dias alegres e agradáveis que juntos passamos: Fabrício, Lila, Carol, Leti, César, Pati, Robertinha, Elisa, Dani, Fabi e Anninha. Também aos queridos amigos e colegas “espalhados” pelo Departamento, especialmente aos amigos dos laboratórios 21 e 23. Em especial às queridonas Carolina Klein e Juliana Bender Hoppe.

Às minhas amigas de Arroio do Meio, em especial à Adriani Dressler Johann pelo zelo, pela amizade e pela torcida!

À minha mãe Soeli e ao meu pai Lírio, aos quais me faltam palavras para expressar o amor incondicional que sinto por eles! Agradeço pelo exemplo de vida e honestidade. Pelo incentivo e reconhecimento do valor do estudo. Pelo apoio e estímulo constante nesta caminhada. Amo muito vocês!

À minha querida irmã Franciele! Obrigada por me mostrar o lado mais simples e leve da vida, pelas ideias, pelo incentivo, pela motivação e pela companhia. Te admiro muito pela profissional que você se tornou! Te amo demais!

Ao meu namorado Fernando, pelo carinho, pela paciência, pelo incentivo, e pelos inúmeros momentos felizes e nem tão felizes que juntos compartilhamos. Obrigada por entender as inúmeras vezes em que não pude compartilhar de algum momento importante contigo! Te amo muito!

Ao meu cunhado Jean, pela preocupação, incentivo e reconhecimento do valor do estudo!

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe."

Clarice Lispector

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ESQUEMAS	17
APRESENTAÇÃO.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 A bexiga urinária	19
1.1.1 Cistite hemorrágica.....	20
1.1.1.1 Etiologia	20
1.1.1.1.1 Ciclofosfamida: um dos principais determinantes da cistite hemorrágica	20
1.1.1.1.2 Mediadores pró-inflamatórios envolvidos.....	22
1.1.1.1.3 Apresentação clínica.....	22
1.1.1.1.4 Tratamento.....	23
1.1.2 Câncer de bexiga	24
1.1.2.1 Epidemiologia.....	24
1.1.2.2 Origem.....	24
1.1.2.3 Fatores de risco.....	25
1.1.2.4 Apresentação clínica.....	26
1.1.2.5 Diagnóstico, classificação e estadiamento.....	26
1.1.2.6 Tratamento.....	29
1.2 Sinalização purinérgica: abordagem na bexiga urinária.....	30
1.2.1 Nucleotídeos extracelulares.....	30
1.2.2 Receptores purinérgicos	32

1.2.2.1 Receptores P2X	33
1.2.2.2 Receptores P2Y	34
1.2.2.3 Receptores P1	35
1.2.3 A família das ectonucleotidases	36
1.2.3.1 A família das NTPDases.....	37
1.2.3.2 A família das NPPs.....	39
1.2.3.3 Fosfatases alcalinas.....	40
1.2.3.4 Ecto-5'-nucleotidase/CD73	40
1.2.3.5 Ecto-adenosina desaminase	41
1.2.3.6 Adenosina cinase	42
1.3 Estratégias terapêuticas para patologias da bexiga urinária	42
1.3.1 <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC.....	43
1.3.1.1 Aspectos botânicos e geográficos.....	43
1.3.1.2 Aspectos fitoquímicos	43
1.3.1.3 Aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos.....	44
1.3.2 Radioterapia.....	47
1.3.2.1 Radioterapia no câncer de bexiga.....	48
2. OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo geral	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
3. RESULTADOS	51
3.1 Capítulo 1	51
3.2 Capítulo 2	67
3.3 Capítulo 3	91
3.4 Capítulo 4	134
4. DISCUSSÃO.....	152

5. CONCLUSÕES	174
5.1 Conclusões gerais	174
5.2 Conclusões específicas	174
6. PERSPECTIVAS	177
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179
8. ANEXOS	196
8.1 Cópia do certificado de aprovação do comitê de ética para o desenvolvimento dos experimentos <i>in vivo</i>	196
8.2 Laudo de certificação botânica e autorização de importação da espécie vegetal <i>Uncaria tomentosa</i>	197
8.3 Outros artigos científicos publicados como autora e em coautoria durante o período do doutorado:.....	199

RESUMO

A bexiga urinária é exposta constantemente a substâncias potencialmente prejudiciais presentes na urina, cuja exposição crônica pode levar a diversas patologias. Dentre estas patologias está a cistite hemorrágica que é uma condição inflamatória grave da bexiga associada ao uso de fármacos quimioterápicos, como a ciclofosfamida. É descrito que a exposição em longo prazo à ciclofosfamida aumenta o risco de desenvolvimento do câncer de bexiga, o qual é caracterizado como sendo a segunda neoplasia mais comum do trato urinário e o sétimo câncer mais prevalente entre homens no mundo. Alterações na sinalização purinérgica têm sido evidenciadas em diferentes patologias associadas à bexiga urinária. De fato, o sistema purinérgico tem emergido como um potencial alvo a ser estudado. Portanto, nesta tese buscou-se avaliar o envolvimento da sinalização purinérgica em um modelo *in vivo* de cistite hemorrágica e em um modelo *in vitro* de câncer de bexiga. No intuito de identificar estratégias preventivas e tratamentos eficazes para reduzir a morbidade e a mortalidade associadas à cistite hemorrágica, a espécie *Uncaria tomentosa* foi investigada, devido a sua ampla utilização em casos de inflamação crônica e doenças do trato urinário. A partir dos estudos conduzidos *in vivo*, demonstramos que o tratamento sistêmico com a fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico de *U. tomentosa* foi capaz de prevenir os eventos nociceptivos e inflamatórios associados à cistite hemorrágica. A diminuição da expressão dos receptores P2X₇, provavelmente pela inibição da migração dos neutrófilos ao local da inflamação foi observada, evidenciando propriedades anti-inflamatórias promissoras para esta fração podendo, no futuro, se tornar um agente terapêutico potencial no tratamento desta patologia. Para o câncer de bexiga músculo invasivo, a cistectomia radical é considerada o tratamento padrão, porém está associada à morbidade significativa. Na tentativa de proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes, o interesse por abordagens terapêuticas que visam à preservação da bexiga urinária tem aumentado. Neste sentido, a radioterapia tem recebido destaque por ser uma modalidade de tratamento já utilizada. Desta forma, investigamos os efeitos da radioterapia sobre a sinalização purinérgica em linhagem celular de câncer de bexiga humano T24. Dentre os receptores expressos pelas células T24, o receptor P2X₆ apresentou aumento expressivo após a radioterapia. A partir da análise de pacientes com câncer de bexiga (Kaplan-Meier), evidenciamos a relação existente entre a alta expressão deste receptor e o aumento da taxa de sobrevivência. Na sequência, o provável envolvimento da família das ectonucleotidases nos efeitos da radioterapia na linhagem celular T24 também foi avaliado. Observamos que a sinalização purinérgica, principalmente via hidrólise do ATP à adenosina pela ação combinada de ectoenzimas demonstrou papel importante no tratamento radioterápico *in vitro*. A indução transitória da expressão da enzima ecto-5'NT/CD73 pela radioterapia também foi observada, sendo a adenosina gerada a responsável por contribuir na morte celular. O papel crucial da ecto-5'NT/CD73 na radiosensibilização das células foi confirmado pela inibição farmacológica e pelo uso do nocaute da enzima. Em conjunto, os resultados *in vitro* demonstraram que a vantagem da radioterapia parece ser alcançada naqueles pacientes que expressam o receptor P2X₆ e a enzima ecto-5'NT/CD73 na área tumoral, podendo no futuro, ambos serem considerados possíveis marcadores para prever a eficácia da resposta à radioterapia para o tratamento do câncer de bexiga. Por fim, a realização do ensaio radiométrico frente à ecto-5'NT/CD73 evidenciou o potente efeito inibitório do ácido ursólico sobre esta enzima, cujo potencial também foi confirmado frente à linhagem celular T24.

ABSTRACT

The urinary bladder is constantly exposed to potentially harmful substances in the urine, whose chronic exposure can lead to various diseases. Among these pathologies the hemorrhagic cystitis is a severe inflammatory condition of the bladder associated with the use of chemotherapeutic drugs, such as cyclophosphamide. It has been reported that long-term exposure to cyclophosphamide increases the risk of developing bladder cancer, which is characterized as being the second most common cancer of the urinary tract and the seventh most common cancer among men in the world. Alterations in the purinergic signaling have been shown in diseases associated with urinary bladder. In fact, the purinergic signaling has emerged as a potential target to be studied. Therefore, this thesis sought to evaluate the involvement of purinergic signaling in an *in vivo* model of hemorrhagic cystitis and in an *in vitro* model of bladder cancer. In order to identify preventive strategies and effective treatments to reduce morbidity and mortality associated with hemorrhagic cystitis, the *Uncaria tomentosa* species was investigated due to its wide use in cases of chronic inflammation and urinary tract diseases. From studies conducted *in vivo*, we demonstrated that systemic treatment with the quinovic acid glycosides purified fraction from *U. tomentosa* was able to prevent nociceptive and inflammatory events associated with hemorrhagic cystitis. The decreased expression of the P2X₇ receptor was observed, most likely by the reduction of neutrophils migration to the site of inflammation. Therefore, this investigation has shown promising anti-inflammatory properties for this fraction, which may in the future become a potential therapeutic agent for the treatment of this pathology. For bladder muscle invasive cancer, although radical cystectomy has been considered the standard treatment is still associated with significant morbidity. In an attempt to provide a better quality of life for patients, interest in therapeutic approaches aimed the preservation of the urinary bladder have increased. In this regard, the radiotherapy has been highlighted by being a treatment modality already used. Thus, we investigated the effects of radiation on the purinergic signaling in T24 human bladder cancer cell line. Among the receptors expressed by T24 cells, the P2X₆ receptor showed significant increase after radiotherapy. From the analysis of patients with bladder cancer (Kaplan-Meier), we noticed the relationship between high expression of this receptor and increased survival rate. Following, the involvement of ectonucleotidases after irradiation exposure in T24 cell line was also evaluated. The purinergic signaling, mainly through hydrolysis of ATP to adenosine by the combined action of ectoenzymes, demonstrated important role in radiotherapy *in vitro*. The transient induction of ecto-5'NT/CD73 expression by radiotherapy was also observed, being the adenosine generated a possible responsible in T24 cell death. The crucial role of ecto-5'NT/CD73 in the radiosensitization of the cells was confirmed by pharmacological inhibition and the use of the enzyme knockout. Taken together, the *in vitro* results demonstrate that the benefit of radiation therapy appears to be achieved in those patients that express the P2X₆ receptor and the enzyme ecto-5'NT/CD73 in the tumor area, and in the future both may be considered potential markers for predicting the effectiveness response to radiotherapy for the treatment of bladder cancer. Finally, the radiometric ecto-5'NT/CD73 assay showed the potent inhibitory effect of ursolic acid on this enzyme, whose potential was also confirmed through the T24 cell line.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADK – adenosina cinase (*adenosine kinase*)
- ADO – adenosina (*adenosine*)
- ADP – adenosina difosfato (*adenosine diphosphate*)
- AMP – adenosina monofosfato (*adenosine monophosphate*)
- AMPC – adenosina monofosfato cíclico (*cyclic adenosine monophosphate*)
- APCP – *adenosine 5'-(α,β ,methylene)diphosphate*)
- APs – fosfatases alcalinas (*ecto-alkaline phosphatase*)
- ATP – adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate*)
- BCG – Bacillus Calmette-Guerin
- CREB – ligação ao elemento de resposta AMPC (*cAMP response element-binding*)
- CYP – ciclofosfamida (*cyclophosphamide*)
- ecto-5'NT/CD73 – ecto-5'-nucleotidase/CD73
- ecto-ADA – ecto-adenosina desaminase (*ecto-adenosine deaminase*)
- EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*)
- EpCAM – molécula de adesão celular epitelial (*epithelial cellular adhesion molecule*)
- INO – inosina (*inosine*)
- Gy – Gray
- HE – cistite hemorrágica (*hemorrhagic cystitis*)
- IL-1 β – interleucina 1 beta (*interleukin-1 β*)
- ISUP – Sociedade Internacional de Urologia Patológica (*International Society of Urological Pathology*)
- Mesna – 2-mercaptoetanosulfonato de sódio (*sodium 2-mercaptoethanesulfonate*)

MPO – mieloperoxidase (*myeloperoxidase*)

NPPs – ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (*ecto-nucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase*)

NTPDases – ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (*ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*)

Pi – fosfato inorgânico (*inorganic phosphate*)

PI – iodeto de propídeo (*propidium iodide*)

P1 – receptor purinérgico metabotrópico para adenosina, dividido nos subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃

P2X – receptor purinérgico ionotrópico para o ATP

P2Y – receptor purinérgico metabotrópico para nucleotídeos

QAPF – fração purificada de glicosídeos do ácido quinóvico da *Uncaria tomentosa* (*quinovic acid glycosides purified fraction from Uncaria tomentosa*)

mOS – sobrevida global média (*median Overall Survival*)

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TNM – tumor-nódulo-metástase

UDP – uridina difosfato (*uridina diphosphate*)

UTP – uridina trifosfato (*uridina triphosphate*)

WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas que estruturalmente compõem a bexiga.	19
Figura 2. Metabolismo da ciclofosfamida.	21
Figura 3. Extensão do câncer de bexiga..	27
Figura 4. Topografia de membrana dos receptores purinérgicos.	33
Figura 5. Topografia de membrana das principais enzimas representantes da família das ectonucleotidasas.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Graduação da cistite hemorrágica conforme definição de Droller et al. (1982)	23
Tabela 2. Sistema TNM utilizado para descrever a extensão da invasão (Tis-T4) e as características celulares do câncer de bexiga.	28

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Ilustração esquemática representando a nossa hipótese de como a QAPF da *U. tomentosa* protege os eventos nociceptivos e inflamatórios induzidos pelo metabólito tóxico da ciclofosfamida: a acroleína. 158
- Esquema 2.** Ilustração esquemática representando a nossa hipótese de como nucleotídeos e nucleosídeos potencializam a morte celular induzida pela radiação (4 Gy) em células de câncer de bexiga T24.. 168
- Esquema 3.** Ilustração esquemática representando a nossa hipótese de como o ácido ursólico e o antagonista seletivo do receptor de adenosina A1 (DPCPX) potencializam a diminuição da viabilidade celular em células de câncer de bexiga humano T24..... 172

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Resultados, Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências Bibliográficas e Anexos.

A Introdução apresenta a fundamentação teórica que nos levou a formular as hipóteses propostas da tese, dispostas no item Objetivos.

Na seção Resultados estão expostos os materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho, assim como os resultados obtidos, descritos em formato de artigo científico completo publicado, submetido ou a ser submetido para publicação.

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes artigos científicos.

A seção Conclusões aborda as conclusões gerais obtidas na tese.

Na seção Perspectivas estão expostas as sugestões de continuidade deste trabalho que poderão constituir novos projetos científicos, dando continuidade à linha de pesquisa.

A seção Referências Bibliográficas lista as referências utilizadas na redação dos itens Introdução e Discussão da tese.

A seção Anexos contém certificado de aprovação do comitê de ética, laudo de certificação botânica e autorização de importação da espécie vegetal estudada, e lista de artigos científicos publicados como autora e em coautoria durante o período do doutorado.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A bexiga urinária

A bexiga urinária é revestida internamente pelo urotélio, que é formado pelas células superficiais “*umbrella*”, células intermediárias e células basais, as quais se apoiam sobre uma membrana basal. Abaixo desta membrana está o tecido conectivo suburotelial, denominado de lâmina própria ou submucosa. O músculo liso detrusor corresponde à camada mais externa da bexiga urinária, sendo circundado pelo tecido conjuntivo adiposo e pelo peritônio (Figura 1) (Wu et al., 2009; Winder et al., 2014).

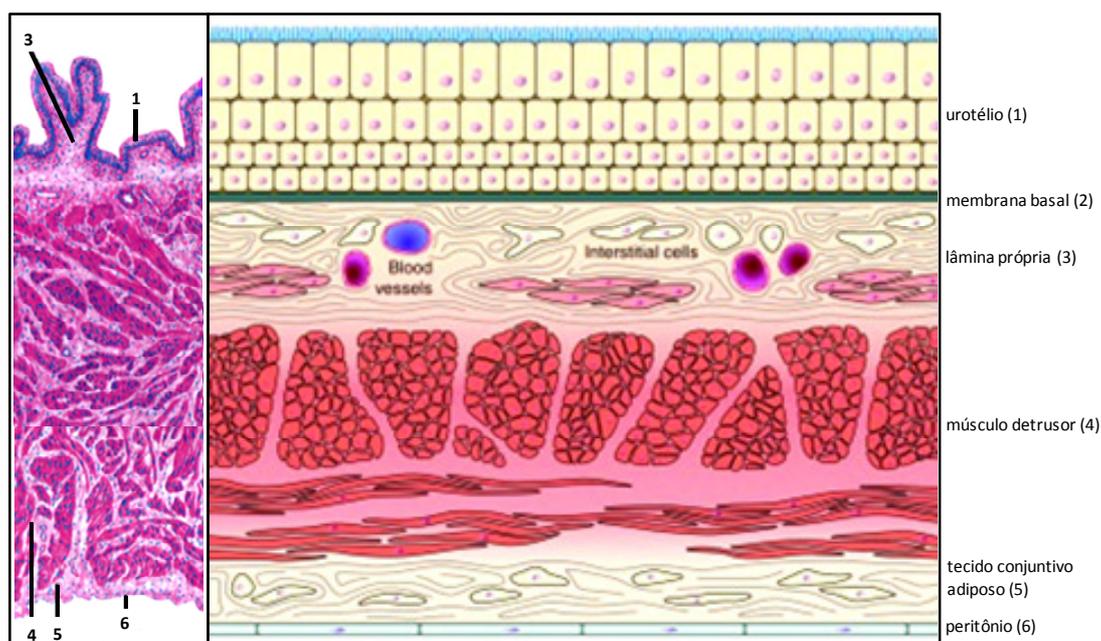


Figura 1. Camadas que estruturalmente compõem a bexiga. [Imagem reproduzida e adaptada de Birder, Andersson, 2013.]

O urotélio apresenta alta taxa de *turnover* (aproximadamente 200 dias), o que é funcionalmente desejável, considerando que ele é uma barreira de permeabilidade constante e altamente eficiente que protege o corpo contra substâncias potencialmente prejudiciais presentes na urina (Wu et al., 2009; Birder, Andersson, 2013; Winder et al.,

2014). No entanto, quando o urotélio é exposto de forma constante a carcinógenos excretados pela urina, ele pode se tornar inflamado, induzindo a morte das células uroteliais e, então, ao desenvolvimento da cistite (Huan et al., 2006; Haldar et al., 2014), podendo progredir a câncer, quando não tratado adequadamente (Park et al., 2014).

1.1.1 Cistite hemorrágica

1.1.1.1 Etiologia

Embora a etiologia da cistite hemorrágica seja variável, os fármacos quimioterápicos e a radioterapia são as causas mais frequentes (Manikandan et al., 2010; Haldar et al., 2014). As oxafosforinas (ciclofosfamida e ifosfamida) e o busulfano estão dentre os fármacos causadores da cistite hemorrágica. Sua ocorrência também tem sido observada após a radioterapia para o tratamento de carcinomas próximos à região pélvica (Cox, 1979; Pode et al., 1983; Manikandan et al., 2010; Haldar et al., 2014). Ainda, pode estar relacionada a outras classes medicamentosas (antibióticos e anti-inflamatórios não esteroides), infecções virais, bacterianas, fúngicas ou parasitárias e/ou agentes tóxicos (anilina e toluidina) (Traxer et al., 2001; Manikandan et al., 2010).

1.1.1.1.1 Ciclofosfamida: um dos principais determinantes da cistite hemorrágica

A ciclofosfamida é um dos fármacos antineoplásicos mais efetivos no tratamento de tumores sólidos (câncer de mama e linfoma), bem como de doenças malignas de células B, sendo também utilizada como imunossupressora em doenças não neoplásicas, como síndrome nefrótica, lúpus e artrite reumatóide (Dobrek, Thor, 2012). No entanto, o uso da ciclofosfamida está associado a manifestações tóxicas como imunotoxicidade, teratogenicidade, genotoxicidade e urotoxicidade (Bhatia et al., 2008). Destas, os efeitos colaterais urológicos são os principais limitantes do seu uso, incluindo sintomas

urinários irritativos, tais como cistite hemorrágica, fibrose da bexiga e necrose (Bhatia et al., 2006).

A ciclofosfamida é um fármaco inativo até sofrer metabolização hepática, via hidroxilação enzimática microsossomal, dando origem a 4-hidroxíciclofosfamida e a seu tautômero acíclico, a aldofosfamida. A 4-hidroxíciclofosfamida e a aldofosfamida são transportadas pela circulação até as células tumorais, onde a 4-hidroxíciclofosfamida pode ser oxidada produzindo metabólitos inativos (4-cetociclofosfamida e carboxifosfamida), enquanto a aldofosfamida é clivada produzindo uma mostarda de fosforamida, que é a forma ativa, e a acroleína, responsável pela toxicidade ao urotélio (Figura 2) (Wong et al., 2000; Rang et al., 2004). Deste modo, a urotoxicidade da ciclofosfamida está relacionada à excreção renal da acroleína (Halдар et al., 2014).

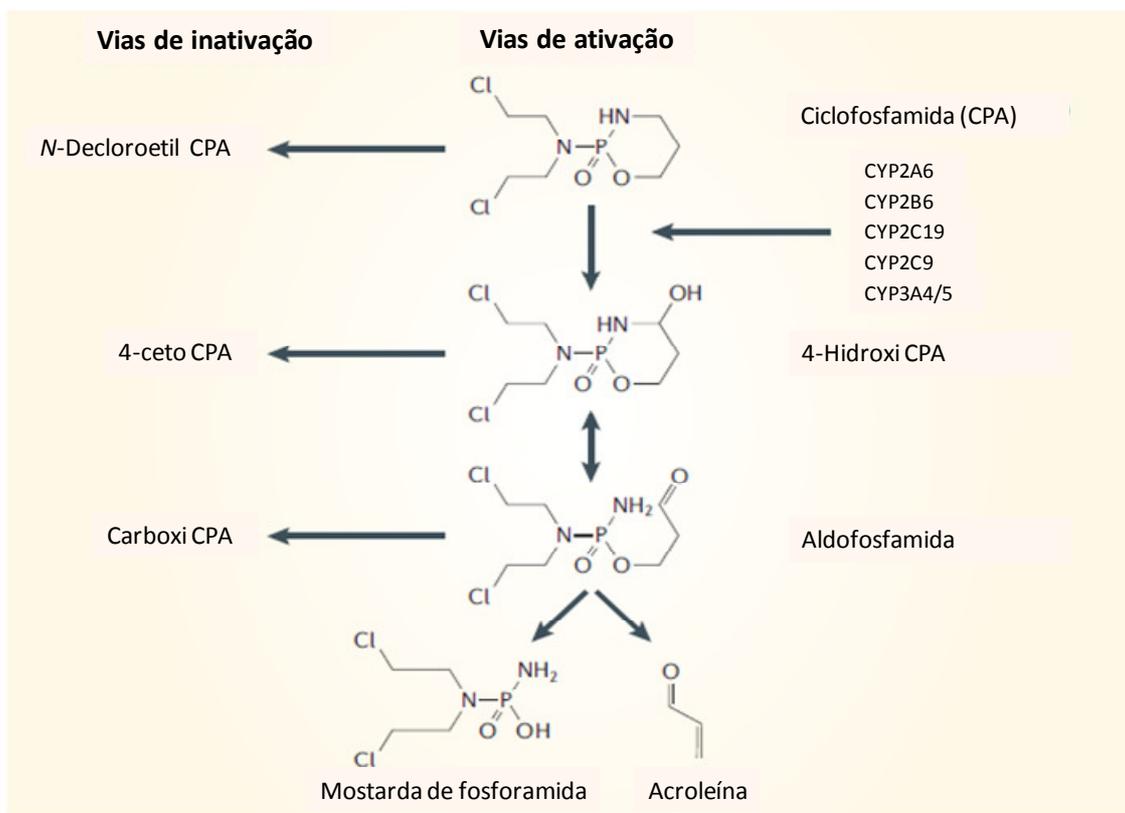


Figura 2. Metabolismo da ciclofosfamida. [Imagem reproduzida e adaptada de Stearns et al., 2006.]

Batista et al. (2006) demonstraram em modelo de camundongo, que a toxicidade induzida por ciclofosfamida é atribuída, principalmente, ao metabólito acroleína, que em contato direto com o urotélio pode causar edema subepitelial, ulceração, neovascularização, hemorragia e necrose. A migração massiva de neutrófilos é outra característica da cistite induzida por ciclofosfamida, como indicado pelo aumento da atividade da mieloperoxidase no tecido da bexiga (Martins et al., 2012).

A acroleína ao acumular-se na bexiga urinária, diretamente cliva proteínas e cadeias do DNA, culminando com uma reação piroapoptótica no urotélio, com ulceração e exposição da musculatura e vasos sanguíneos (Haldar et al., 2014). Cerca de 2 a 40% dos pacientes tratados com ciclofosfamida desenvolvem cistite hemorrágica, com o aparecimento de hematúria 48 horas após o tratamento (Manikandan et al., 2010).

1.1.1.2 Mediadores pró-inflamatórios envolvidos

Tem-se demonstrado que a acroleína promove aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 beta (IL-1 β), a ciclooxigenase-2 (COX-2) e o óxido nítrico (NO), os quais estão diretamente envolvidos na patogênese da cistite no urotélio da bexiga em resposta à terapia com ciclofosfamida (Ribeiro et al., 2002; Hu et al., 2003).

1.1.1.3 Apresentação clínica

A cistite hemorrágica é uma condição inflamatória da bexiga urinária que causa dor intensa, hematúria e sintomas urinários irritativos, podendo ser classificada conforme a sua gravidade (Tabela 1) (Manikandan et al., 2010; Haldar et al., 2014).

Tabela 1. Graduação da cistite hemorrágica conforme definição de Droller et al. (1982).
[Adaptado de Payne et al., 2013.]

Grau/Sintomas
0 – Sem sintomas de irritação vesical ou hemorragia
I – Hematúria não visível
II – Hematúria macroscópica
III – Hematúria macroscópica com pequenos coágulos
IV – Hematúria macroscópica causando obstrução do trato urinário, com necessidade de evacuação do coágulo

A manifestação severa desta patologia é caracterizada por eventos inflamatórios intensos como: dor, edema, hemorragia, ulceração, necrose, infiltração de células inflamatórias (neutrófilos) e, raramente, carcinoma das células uroteliais da bexiga (Santos Jr et al., 2010; Manikandan et al., 2010; Haldar et al., 2014).

1.1.1.4 Tratamento

Considerando que a acroleína é reconhecida como o agente tóxico da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, a necessidade de prevenir esta doença pela inativação deste composto se torna evidente. Alternativas como hidratação, diurese vigorosa e irrigação contínua da bexiga vêm sendo utilizadas para diminuir a duração da exposição do urotélio à acroleína. Agentes como o 2-mercaptoetanosulfonato de sódio (Mesna) que detoxificam a ciclofosfamida e seus metabólitos têm sido usados, apesar da detoxificação da acroleína não prevenir completamente os sintomas da cistite hemorrágica (Zupancic et al., 2008; Manikandan et al., 2010). Mesna é um fármaco clinicamente utilizado para prevenir a ocorrência da cistite hemorrágica em pacientes sob tratamento com a ciclofosfamida (Batista et al., 2006; Haldar et al., 2014), cuja ação é se ligar a acroleína formando um composto atóxico; porém, sem anular a atividade do fármaco antitumoral (Morais et al., 1999). Contudo, Mesna não tem se mostrado

eficiente quando a lesão já está estabelecida (Morais et al., 1999; Haldar et al., 2014). Conseqüentemente, outros métodos têm sido utilizados, como instilação intravesical de salina, formalina, nitrato de prata e prostaglandinas; administração oral de dissulfiram e de *N*-acetilcisteína; e terapia com oxigênio hiperbárico. Em casos severos, a cistite hemorrágica está associada com morbidade significativa, hospitalização prolongada e mortalidade ocasional, e pode exigir medidas mais agressivas, como desvio supravesical urinário e cistectomia (Manikandan et al., 2010; Payne et al., 2013; Haldar et al., 2014; Janicki et al., 2016).

1.1.2 Câncer de bexiga

1.1.2.1 Epidemiologia

O câncer de bexiga é o décimo primeiro câncer de maior incidência no mundo. É o sétimo câncer mais frequente em homens e uma das neoplasias mais prevalentes que afetam o trato urinário, sendo no ano de 2015, o responsável por aproximadamente 468.400 novos casos e 179.800 mortes (GLOBOCAN, 2012). Conforme dados do Instituto Nacional do Câncer, para o ano de 2016 estão previstos 9.670 novos casos de câncer de bexiga no nosso país, sendo que destes, 850 se referem a novos casos no estado do Rio Grande do Sul (INCA, 2016).

O câncer de bexiga apresenta frequência três vezes maior em homens que em mulheres e uma maior incidência em países desenvolvidos (Ploeg et al., 2009; Knowles, Hurst, 2015). Devido ao aumento da exposição aos fatores de risco, crescimento e envelhecimento da população mundial é previsto que ocorra um aumento significativo na incidência deste câncer também nos países em desenvolvimento (Ploeg et al., 2009).

1.1.2.2 Origem

O câncer de bexiga pode ser de origem urotelial ou mesenquimal. Aqueles de origem urotelial constituem a grande maioria dos tumores, sendo o carcinoma urotelial o mais frequente (90%). Os tipos restantes incluem o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas e outros tipos histológicos raros. Tumores de origem mesenquimal correspondem aos sarcomas, que são característicos de grandes tumores sólidos. Representam de 1-5% dos tumores vesicais e, em geral, são raros (Netto Jr, 1999; Cotran et al., 2000; Knowles, Hurst, 2015).

1.1.2.3 Fatores de risco

A idade é o fator de risco mais significativo para o desenvolvimento do câncer de bexiga, sendo a idade média no momento do diagnóstico, de aproximadamente 55 a 70 anos (Ploeg et al., 2009; Jacobs et al., 2010; Knowles, Hurst, 2015).

Exposições ambientais também têm sido identificadas como as responsáveis pela maioria dos casos de câncer de bexiga. Entre os fatores de risco ambientais identificados estão o tabagismo e a exposição a compostos cancerígenos ocupacionais, tais como benzeno, aminas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos, solventes, metais pesados, diesel, ingestão e exposição ao arsênio. Outros fatores de risco incluem a exposição pélvica à radioterapia, inflamação e infecções crônicas e o uso abusivo de analgésicos e de ciclofosfamida (Jacobs et al., 2010; Griffiths, 2013; Knowles, Hurst, 2015). O tabagismo é indicado como o fator de risco ambiental mais proeminente, sendo responsável por mais de 50% do total dos cânceres de bexiga (Griffiths, 2013; Knowles, Hurst, 2015). As infecções crônicas da bexiga também aumentam o risco deste câncer, sendo mais frequente entre os indivíduos que abrigam o parasita *Schistosoma haematobium* (Ploeg et al., 2009). A exposição em longo prazo à ciclofosfamida aumenta de quatro a nove vezes o risco de desenvolvimento do câncer de bexiga

(Cotran et al., 2000; Griffiths, 2013). Embora o envolvimento do histórico familiar não seja evidente, estudos sugerem que polimorfismos nos genes NAT2 (*N*-acetyltransferase 2) e GSTM1 (glutathione S-transferase- μ 1) são responsáveis por 31% dos casos de câncer de bexiga (García-Closas et al., 2005).

1.1.2.4 Apresentação clínica

A hematúria indolor é a sintomatologia mais frequente, acometendo aproximadamente 85% dos pacientes. A irritabilidade vesical caracterizada por disúria, polaciúria e urgência miccional é outra manifestação clínica geralmente associada a tumores mais agressivos. Dor lombar e pélvica e edema dos membros inferiores são sinais e sintomas secundários, decorrentes de metástases ou comprometimento de órgãos próximos à bexiga (Netto Jr, 1999; Jacobs et al., 2010; Park et al., 2014).

1.1.2.5 Diagnóstico, classificação e estadiamento

A investigação diagnóstica inicial geralmente envolve cistoscopia e citologia urinária. A cistoscopia é o padrão ouro para a detecção de novos e recorrentes casos e para o estadiamento do câncer de bexiga (Griffiths, 2013; Park et al., 2014). A citologia urinária consiste de um método não invasivo de alta especificidade para doença de alto grau. Em contrapartida, devido à baixa sensibilidade, apresenta uso limitado para doença de baixo grau. Os marcadores tumorais detectáveis na urina, apesar de promissores, até o momento não apresentam acurácia suficiente para serem substituídos pela cistoscopia ou citologia (Agarwal et al., 2008; Park et al., 2014; Knowles, Hurst, 2015).

A partir da biópsia, os tumores de bexiga são classificados conforme a graduação tumoral, que é baseada na aparência microscópica e na profundidade da

invasão. De acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO) de 1973, tumores papilares eram classificados como graus 1, 2 e 3. A partir de 2004, a WHO e a Sociedade Internacional de Urologia Patológica (ISUP), recomendaram a utilização de uma nova classificação, onde tumores papilares são agora classificados como malignidade urotelial papilar de baixo potencial maligno (PUNLMP; equivalente ao grau 1), carcinoma urotelial papilar de baixo ou alto grau (grau 2) ou carcinoma urotelial papilar de alto grau (grau 3) (Figura 3) (Jacobs et al., 2010; Knowles, Hurst 2015).

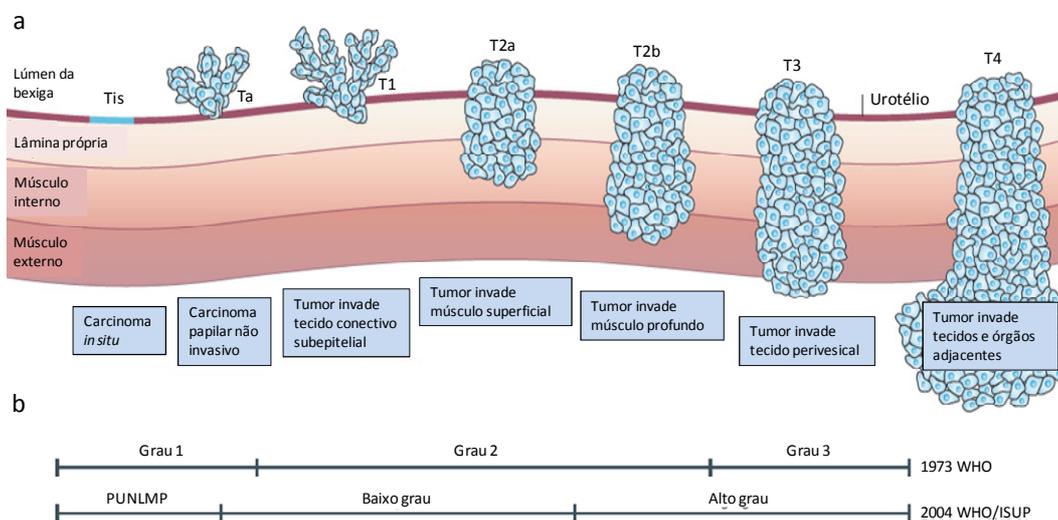


Figura 3. Extensão do câncer de bexiga. **a)** Estadiamento do câncer de bexiga de acordo com o sistema tumor-nódulo-metástase (TNM). **b)** Classificação do câncer de bexiga de acordo com os critérios estabelecidos pela WHO 1973 e pela WHO/ISUP 2004. [Imagem reproduzida e adaptada de Knowles, Hurst, 2015.]

O carcinoma urotelial é o tipo histológico predominantemente diagnosticado em países ocidentais, representando 90% de todos os casos de câncer de bexiga (Park et al., 2014; Knowles, Hurst, 2015). Estes tumores são classificados usando o sistema tumor-nódulo-metástase (sistema TNM), onde T representa a extensão clínica do tumor, N os linfonodos comprometidos e M a presença de metástase, conforme demonstrado na Tabela 2 (Knowles, Hurst, 2015).

Tabela 2. Sistema TNM utilizado para descrever a extensão da invasão (Tis-T4) e as características celulares do câncer de bexiga. [Adaptado de Jacobs et al., 2010.]

Tumor primário (T)
TX – Tumor primário não pode ser avaliado
T0 – Sem evidência de tumor primário
Tis – Carcinoma <i>in situ</i> : “tumor plano”
Ta – Carcinoma papilar não invasivo
T1 – Tumor invade a lâmina própria
T2 – Tumor invade a musculatura própria
pT2a – Tumor invade a musculatura própria superficial (metade interna)
pT2b – Tumor invade a musculatura própria profunda (metade externa)
T3 – Tumor invade o tecido perivesical
pT3a – Microscopicamente
pT3b – Macroscopicamente (massa extravesical)
T4 – Tumor invade estroma prostático, vesícula seminal, útero, vagina, parede pélvica e/ou parede abdominal
T4a – Tumor invade próstata, útero ou vagina
T4b – Tumor invade parede pélvica ou abdominal

Linfonodos regionais (N)
Linfonodos regionais incluem ambas as regiões de drenagem primária e secundária. Todos os outros nódulos acima da bifurcação aórtica são considerados linfonodos distantes.
NX – Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0 – Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1 – Metástase em um único linfonodo regional na pelve (linfonodos hipogástrico, obturador, ilíaca externa ou pré-sacral)
N2 – Metástases múltiplas em linfonodo regional na pelve (metástases nos linfonodos hipogástrico, obturador, ilíaca externa ou pré-sacral)
N3 – Metástases dos linfonodos para os linfonodos ilíacos comuns

Metástase distante (M)
M0 – Ausência de metástase à distância
M1 – Presença de metástase à distância

O câncer de bexiga é uma doença heterogênea classificada com base na sua progressão e ocorrência, em: câncer de bexiga não invasivo, câncer de bexiga músculo invasivo ou metastático (Kirkali et al., 2005; Park et al., 2014). Cerca de 70-75% dos tumores de bexiga são diagnosticados como câncer de bexiga não invasivo e de baixo grau, envolvendo os estágios clínicos Tis, Ta e T1 (Figura 3) (Kirkali et al., 2005; Griffiths, 2013; Park et al., 2014; Knowles, Hurst, 2015). Em geral apresentam um bom prognóstico, sendo que aproximadamente 90% dos pacientes sobrevivem por 5 anos. Contudo, em torno de 50-70% desses pacientes apresentam recorrências dentro de 6-12 meses, com desenvolvimento de doença invasiva ou metastática em 10-15% dos pacientes (Park et al., 2014; Knowles, Hurst, 2015). Aproximadamente 20-25% dos cânceres de bexiga são diagnosticados como tumores músculo invasivo (T2-T4) (Figura 3), estando associados com significativo risco de metástases subsequentes (50%) e uma taxa de sobrevivência significativamente reduzida de 5 anos (~50%). Os pacientes que desenvolvem doença metastática apresentam uma média de sobrevivência de 12-15 meses, demonstrando a natureza agressiva desta doença (Dudek et al., 2013; Griffiths, 2013; Park et al., 2014; Knowles, Hurst, 2015).

1.1.2.6 Tratamento

O tratamento do câncer de bexiga varia conforme a natureza invasiva do tumor. Tumores não invasivos podem ser removidos por ressecção transuretral, seguido de quimioterapia ou imunoterapia adjuvante para a prevenção da recorrência (Dudek et al., 2013; Park et al., 2014; Knowles, Hurst, 2015). A administração intravesical do Bacillus Calmette-Guerin (BCG) após a ressecção transuretral, tem sido o tratamento mais efetivo contra o câncer de bexiga não invasivo. A instilação da BCG induz citotoxicidade direta e uma resposta imune localizada que é capaz de eliminar as células

cancerígenas (Schenkman, Lamm, 2004; Knowles, Hurst, 2015; Wu et al., 2015). No entanto, os efeitos adversos da terapia da BCG, tais como cistite (~80% dos pacientes), hematúria, irritação da bexiga, mal-estar e febre são comuns, e aproximadamente 40% dos pacientes não respondem a este tratamento, ocorrendo a progressão tumoral durante a terapia (Payne et al., 2013; Schenkman, Lamm, 2004; Wu et al., 2015).

O tratamento de tumor músculo invasivo requer cistectomia radical seguido de desvio urinário ou radioterapia. Quimioterapia neoadjuvante é recomendada antes do tratamento definitivo. A combinação da quimioterapia e radioterapia é indicada devido à alta taxa de progressão para doença metastática (Griffiths, 2013; Knowles, Hurst, 2015).

Devido à necessidade da vigilância constante do paciente, de tratamentos repetidos para a doença recorrente e dos custos das complicações associadas ao tratamento, o câncer de bexiga é considerado o câncer mais dispendioso (Jacobs et al., 2010; Knowles, Hurst, 2015).

1.2 Sinalização purinérgica: abordagem na bexiga urinária

1.2.1 Nucleotídeos extracelulares

Nucleotídeos e nucleosídeos representam uma importante e ubíqua classe de moléculas sinalizadoras que exercem diversos efeitos biológicos (Yegutkin, 2008). A adenosina 5'-trifosfato (ATP) é um exemplo de nucleotídeo púrico que, além de agir intracelularmente como molécula energética, também age como uma potente molécula de sinalização no meio extracelular (Yegutkin, 2008; Burnstock, 2014). Na bexiga urinária o ATP é a molécula de sinalização que exerce papel crucial tanto na sensação de plenitude quanto em muitas alterações da bexiga (Burnstock, 2014; Winder et al., 2014).

O ATP é liberado do urotélio em resposta a distensão da superfície urotelial da bexiga urinária, provavelmente iniciada pelo aumento da tensão nas células *umbrella* (Wang et al., 2005; Birder, Andersson, 2013; Winder et al., 2014). A liberação do ATP pelas células uroteliais também pode ser induzida por mediadores presentes na urina, mediadores liberados de processos neuronais e em resposta a inflamação e/ou morte celular (Yegutkin, 2008; Winder et al., 2014). A liberação do ATP no urotélio ocorre principalmente por meio do transporte vesicular ou exocitose (Wang et al., 2005) e, em pequena extensão, pelos hemicanais de panexinas (Negoro et al., 2013; Timóteo et al., 2014). O ATP pode ser liberado do urotélio a partir de ambos os compartimentos da parede da bexiga urinária (mucosa – recobre a porção interna; serosa – recobre a porção externa do órgão) e, assim, atuar como um importante mediador autócrino e parácrino, respectivamente, por meio da ativação de receptores específicos denominados de receptores purinérgicos (Wang et al., 2005; Birder, Andersson, 2013; Winder et al., 2014).

A sinalização na bexiga urinária é finamente ajustada à maquinaria das moléculas de sinalização e dependente do tipo de receptores purinérgicos expressos bem como da expressão de enzimas denominadas ectonucleotidases (Winder et al., 2014). Em relação à concentração de ATP no espaço extracelular (nanomolar), esta é regulada tanto pela liberação do nucleotídeo como pela sua hidrólise pelas ectonucleotidases. É proposto que devido à presença destas enzimas na parede da bexiga, a meia-vida do ATP liberado pelo urotélio é encurtada (Lewis, Lewis, 2006). Como consequência, a adenosina passa a ser o nucleosídeo que alcança concentrações mais altas no meio extracelular, tanto via ação das ectonucleotidases, como também pela liberação de adenosina pelo próprio urotélio por mecanismo de estiramento da bexiga urinária (Winder et al., 2014).

Na bexiga urinária, a sinalização purinérgica tem, portanto, papel essencial, principalmente na contração e no relaxamento muscular durante os ciclos miccionais. Para iniciar a micção, terminações parassimpáticas liberam ATP estimulando a contração do músculo liso da bexiga, via receptor purinérgico P2X₁. A enzima NTPDase 1 é capaz de hidrolisar dois fosfatos do ATP e assim converter rapidamente ATP em AMP que é então hidrolisado à adenosina pela ecto-5'-nucleotidase/CD73, cessando o efeito do ATP sobre os receptores P2X₁ e facilitando o relaxamento muscular via receptores A_{2B}. Assim, o ATP é considerado um “efetor duplo” porque é responsável tanto pela fase de contração quanto pela fase de relaxamento muscular no reflexo da micção, via ação coordenada das enzimas NTPDase 1 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Yu et al., 2011).

1.2.2 Receptores purinérgicos

Na membrana celular estão ancorados os receptores purinérgicos, um dos grupos de receptores mais antigos evolutivamente (Burnstock, Verkhratsky, 2009). Estes receptores estão divididos em P1 e P2 (Figura 4), sendo os P1 preferencialmente ativados pela adenosina enquanto os P2 são ativados por uma variedade de nucleotídeos (ATP, ADP, UTP e UDP) (Ralevic, Burnstock, 1998). A identificação da existência destas duas famílias de receptores de membrana foi descrita pela primeira vez em 1978 (Burnstock, 1978) e, mais tarde, os receptores com preferência por nucleosídeos di- e trifosfatados (P2) foram subdivididos em receptores P2X e P2Y, com base na sua estrutura molecular, mecanismo de ação e propriedades farmacológicas (Burnstock, Kennedy, 1985).

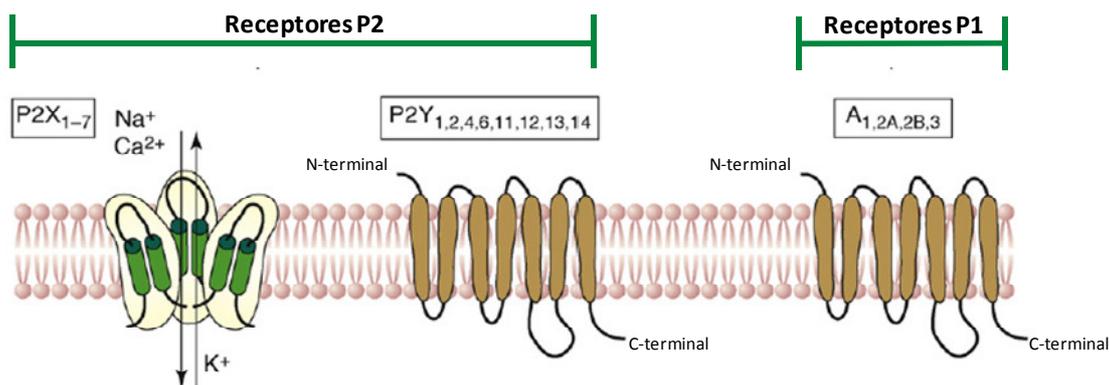


Figura 4. Topografia de membrana dos receptores purinérgicos. [Imagem reproduzida e adaptada de Abbracchio et al., 2009.]

1.2.2.1 Receptores P2X

Os receptores P2X são canais catiônicos sensíveis ao ATP e presentes em diversos organismos, indicando que a sinalização do ATP via estes receptores é um mecanismo comum (Jarvis, Khakh, 2009). Até o momento, sete membros desta família foram identificados: P2X₁ a P2X₇ (Burnstock, 2004).

Os receptores P2X são trímeros proteicos transmembrana (Figura 4), cuja diversidade dos fenótipos é determinada por ligações de subunidades individuais. Com exceção dos receptores P2X₆, os quais não formam homoméricos funcionais, os demais receptores são classificados em homoméricos (subunidades codificadas pelo mesmo gene; P2X₁-P2X₅ e P2X₇) ou em heteroméricos (subunidades codificadas por genes de diferentes receptores P2X; P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/5}, P2X_{2/6}, P2X_{4/5}, P2X_{4/6} e P2X_{4/7}) (Burnstock, 2006; Abbracchio et al., 2009; Compan et al., 2012).

A ativação dos receptores P2X resulta em permeabilidade celular rápida (~10ms) e seletiva de cátions (Na⁺/K⁺/Ca²⁺) pela abertura de canais iônicos na membrana plasmática (North, 2002). Na presença de baixas concentrações de ATP (micromolar) todos os receptores P2X promovem a abertura dos canais iônicos. No entanto, quando na presença de altas concentrações de ATP (milimolar) ou em resposta a ativação

repetida ou prolongada, o receptor P2X₇ pode também promover a abertura de poros que são permeáveis a grandes moléculas orgânicas (600 – 800 Da) (Alves et al., 2014; Sperlágh, Illes, 2014).

Apesar de contradições na literatura, foi demonstrado que o urotélio da bexiga urinária sadia de humanos expressa os receptores P2X₂, P2X₃, P2X₄ e P2X₅ (Tempest et al., 2004; Shabir et al., 2013). Outros estudos, porém, apontam que os sete receptores P2X estão presentes no urotélio de várias espécies (Khandelwal et al., 2009).

1.2.2.2 Receptores P2Y

Os receptores P2Y são receptores acoplados à proteína G e caracterizados por sete domínios proteicos transmembrana, cuja cauda N-terminal está voltada para o meio extracelular e a C-terminal para o meio intracelular (Figura 4). A cauda C-terminal apresenta diversidade estrutural entre os receptores P2Y, assim influenciando o grau de acoplamento com as proteínas G_{q/11}, G_s e G_i. Com base nisto, dois grupos são reconhecidos. O grupo dos receptores P2Y_{1,2,4,6,11} os quais majoritariamente acoplam à proteína G_{q/11} induzindo a liberação de cálcio intracelular via ativação da fosfolipase C e inositol trifosfato (IP₃); e o grupo dos receptores P2Y_{12,13,14} os quais acoplam à proteína G_{i/o} modulando os canais iônicos, com consequente inibição da adenilato ciclase (Burnstock, 2006; Abbracchio et al., 2009).

Atualmente oito receptores P2Y (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) foram identificados e caracterizados quanto a sensibilidade a nucleotídeos de adenina, uracila ou ambos. Alguns destes receptores são ativados principalmente por nucleosídeos difosfatados (P2Y_{1,6,12,13}), enquanto outros por nucleosídeos trifosfatados (P2Y_{2,4}). Adicionalmente, alguns são ativados por ambos os nucleotídeos púricos e pirimídicos (P2Y_{2,4,6}), enquanto outros somente por nucleotídeos púricos (P2Y_{1,11,12,13}) (Burnstock, 2004;

Burnstock, 2006). A ativação dos receptores P2Y resulta em tempo de resposta ao estímulo mais lento (>100ms) se comparado aos receptores P2X, visto que os receptores P2Y conduzem a ativação de diferentes sistemas de segundos mensageiros via proteína G (Abbracchio et al., 2006).

No urotélio da bexiga humana e de felinos, os receptores P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₄ foram identificados estar expressos (Birder et al., 2004; Shabir et al., 2013). Nas células uroteliais de ratos, somente P2Y₂ e P2Y₄ foram identificados (Chopra et al., 2008).

1.2.2.3 Receptores P1

A adenosina extracelular induz suas respostas fisiológicas via interação e ativação de um ou mais dos quatro distintos receptores transmembrana de adenosina denominados A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Figura 4). Estes quatro subtipos de receptores de adenosina estão acoplados à proteína G e foram caracterizados com base em suas particularidades moleculares e farmacológicas. Enquanto os receptores A₁ e A₃, acoplados à proteína G_{i/o}, inibem a atividade da adenilato ciclase e da proteína cinase A com consequente diminuição dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) intracelular; os receptores A_{2A} e A_{2B}, acoplados à proteína G_s, têm efeito estimulatório sobre a adenilato ciclase e proteína cinase A induzindo ao aumento dos níveis de cAMP (Ralevic, Burnstock, 1998; Haskó, Cronstein, 2004; Stagg, Smyth, 2010; Longhi et al., 2013).

Os receptores P1 também diferem quanto à concentração de adenosina necessária para a sua ativação, sendo que para os receptores A₁, A_{2A} e A₃ concentrações fisiológicas deste nucleosídeo são suficientes (abaixo de 1 µM); enquanto altas concentrações de adenosina são necessárias para ativação do receptor A_{2B} (acima de 20 µM), as quais podem ser geradas sob condições patofisiológicas (Fredholm et al., 2001;

Longhi et al., 2013). É evidente, portanto, que o receptor A_{2B} difere dos demais pela sua afinidade relativamente baixa pela adenosina (Feoktistov, Biaggioni, 1997).

Devido a sua ampla distribuição, os receptores de adenosina têm sido implicados em vários processos fisiológicos. Destacamos aqui o papel crucial da adenosina nas vias de progressão celular, atuando na modulação das vias de proteção e proliferação (A_1 , A_2 e A_3), bem como de apoptose (A_3) (Spsychala, 2000; Latini, Pedata, 2001).

No urotélio de coelhos, ratos e camundongos a presença dos quatro receptores de adenosina P1 foi observada (Khandelwal et al., 2009; Winder et al., 2014). Na linhagem celular de câncer de bexiga humano T24 a caracterização destes receptores também já foi investigada. Embora tenha sido descrito que o único receptor de adenosina funcional nesta linhagem seja o A_{2B} , os receptores A_1 e A_{2A} também foram identificados (Phelps et al., 2006).

1.2.3 A família das ectonucleotidases

Os nucleotídeos liberados para o meio extracelular são hidrolisados até seus nucleosídeos correspondentes por meio da ação catalítica das ectonucleotidases (Yegutkin, 2008), as quais apresentam papel chave na regulação da sinalização purinérgica, controlando a concentração e o tempo em que estas moléculas sinalizadoras permanecem no meio extracelular (Lemmens et al., 1996; Zimmermann, 2000). As ectonucleotidases encontram-se ancoradas à membrana plasmática ou à membrana intracelular, com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas, respectivamente (Zimmermann, 2000). Estas enzimas incluem os seguintes membros: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases); Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPPs); Fosfatase alcalina (APs); Ecto-5'-

nucleotidase/CD73 (ecto-5'NT/CD73) e; Ecto-adenosina desaminase (ecto-ADA) (Figura 5) (Zimmermann, 2000; Zimmermann et al., 2012).

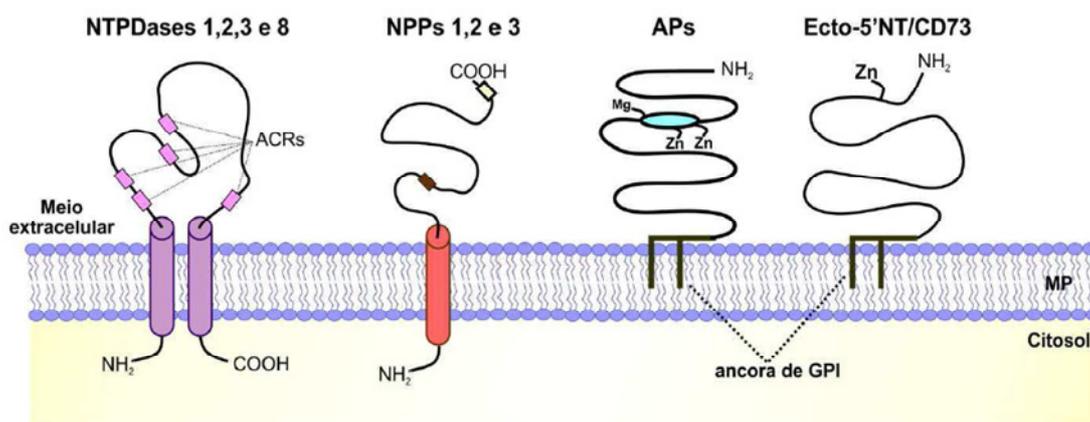


Figura 5. Topografia de membrana das principais enzimas representantes da família das ectonucleotidasas. ACRs – regiões conservadas da apirase; GPI – glicosilfosfatidilinositol; MP – membrana plasmática. [Imagem reproduzida de Cappellari, 2013.]

1.2.3.1 A família das NTPDases

As enzimas da família das NTPDases (EC 3.6.1.5) são ectoenzimas caracterizadas pela sua capacidade de hidrolisar nucleosídeos tri- e/ou difosfatados até seus respectivos nucleosídeos monofosfatados. Esta família compreende oito diferentes membros classificados em ordem da sua descoberta e classificação: NTPDase 1 a 8. Elas diferem entre si quanto à localização celular e propriedades funcionais. As NTPDases 1, 2, 3 e 8 são enzimas de superfície celular (Figura 5); as NTPDases 5 e 6 exibem localização intracelular e, após serem estimuladas nos tecidos em que são expressos, são secretadas; e as NTPDases 4 e 7 apresentam-se inteiramente intracelulares voltadas para o lúmen de organelas citoplasmáticas (complexo de Golgi e retículo endoplasmático) (Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012; Yegutkin, 2014). Todos os membros dessa família apresentam cinco sequências idênticas, denominadas

de regiões conservadas da apirase (ACRs), as quais estão relacionadas com o sítio ativo das enzimas e com a atividade catalítica (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012). Para atingirem a sua atividade catalítica máxima, essas enzimas necessitam de concentrações milimolares dos cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} e de pH entre 7,0 - 8,5 (Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012; Yegutkin, 2014).

As quatro enzimas de superfície celular se encontram ancoradas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana (N- e C-terminal), com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular, sendo assim as mais importantes no controle dos níveis extracelulares de nucleotídeos (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008; 2014). A NTPDase 5 pode ocorrer como uma proteína solúvel, apresentando somente um único domínio extracelular clivável (N-terminal) (Zimmermann, 2000).

A distribuição diferencial da família das NTPDases na bexiga urinária de camundongos saudáveis já foi demonstrada. A NTPDase 3 está presente no urotélio enquanto que a NTPDase 1 e a NTPDase 2 são encontradas na lâmina própria, sendo a NTPDase 1 restrita aos vasos sanguíneos. A NTPDase 1 também é altamente expressa no músculo liso (Yu et al., 2011). A presença da NTPDase 3 no urotélio de camundongos saudáveis foi recentemente confirmada em nosso grupo de pesquisa e uma expressiva diminuição desta enzima foi observada na progressão do câncer de bexiga induzido por N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN) (Rockenbach et al., 2014). Ainda, a expressão destas ectoenzimas também foram evidenciadas nas linhagens celulares de câncer de bexiga humano RT4 e T24, sendo a NTPDase 3 e a NTPDase 5 expressas na linhagem RT4 (representativa de tumor grau 1) e a NTPDase 5 expressa na linhagem T24 (representativa de tumor grau 3) (Stella et al., 2010).

1.2.3.2 A família das NPPs

A família das NPPs (EC 3.6.1.9/EC 3.1.4.1) consiste de sete enzimas, numeradas de acordo com a sua ordem de descoberta: NPP1 a NPP7 (Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012; Yegutkin, 2014). As enzimas desta família são glicoproteínas transmembrana, com cauda N-terminal intracelular e C-terminal extracelular e um domínio catalítico altamente conservado com dois íons Zn^{2+} ligados ao seu sítio ativo (Figura 5) (Zimmermann et al., 2012; Yegutkin, 2014). Estão localizadas na superfície celular como proteínas transmembrana ou como enzimas secretadas (Goding et al., 2003). Formas solúveis para a NPP1, NPP2, NPP3, NPP6 e NPP7 têm sido descritas (Zimmermann et al., 2012; Yegutkin, 2014). Membros dessa família possuem uma ampla especificidade a diferentes substratos, sendo o espectro de substratos não restrito a nucleotídeos. As enzimas NPP1 a NNP3 são capazes de hidrolisar nucleosídeos tri- e difosfatados, ligações pirofosfato e fosfodiéster presentes em nucleotídeos, ácidos nucleicos, bem como lisofosfolipídeos e ésteres de fosfatidilcolina (Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012). Devido a ampla especificidade de substrato, algumas NPPs podem também defosforilar ATP via ADP a AMP, de forma semelhante à NTPDases. Devido ao fato de compartilharem similaridades a substratos específicos e de serem coexpressas em uma ampla variedade de tecidos, a distinção entre os membros das famílias das NPPs e das NTPDases é frequentemente complicada (Yegutkin, 2008). No contexto da sinalização purinérgica, somente as ectoenzimas NPP1 e NPP3 são relevantes, pois são capazes de hidrolisar vários nucleotídeos extracelulares (Yegutkin, 2014).

A expressão da NPP1, NPP2 e NPP3 nas linhagens de câncer de bexiga humano RT4 e T24 foi previamente demonstrada (Stella et al., 2010).

1.2.3.3 Fosfatases alcalinas

As fosfatases alcalinas (APs; EC 3.1.3.1) são proteínas homodiméricas ou heterodiméricas acopladas à membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 5). No seu sítio catalítico encontram-se duas moléculas de Zn^{2+} e uma de Mg^{2+} , as quais são essenciais para a atividade enzimática. A atividade ótima da enzima tem sido identificada em pH alcalino (intervalo de 8-11). Estas enzimas exibem ampla especificidade a substratos, incluindo compostos fosfomonoester e outros compostos fosfatados, nucleotídeos de adenina, pirofosfato, polifosfatos inorgânicos, glicose-6-fosfato, β -glicerofosfato e bis-(p-nitrofenil)-fosfato (Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012; Yegutkin, 2014). A capacidade das APs hidrolisarem nucleosídeos tri-, di- e monofosfatados as qualificam como ectonucleotidases, sendo as únicas enzimas que podem sequencialmente defosforilar um nucleosídeo trifosfatado a seu respectivo nucleosídeo. Portanto, as APs têm o potencial de inativar agonistas de receptores P2 e produzir a adenosina para receptores P1 (Zimmermann, 2000; Zimmermann et al., 2012).

1.2.3.4 Ecto-5'-nucleotidase/CD73

O AMP, produto intermediário da hidrólise do ATP, pode ser hidrolisado pela ecto-5'-nucleotidase, também conhecida como CD73. A ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'NT/CD73; EC 3.1.3.5) é a enzima responsável pela hidrólise de nucleosídeos monofosfatados em seus respectivos nucleosídeos e P_i , sendo considerada a principal fonte enzimática de adenosina no meio extracelular (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008; 2014). Esta enzima é um homodímero que se encontra ancorada à membrana plasmática pela interação entre a cauda C-terminal e uma âncora de GPI (Figura 5). Ligado à sua estrutura N-terminal encontra-se um átomo de zinco e outros metais

divalentes, o que a caracteriza como uma metaloenzima (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008).

Essa enzima é amplamente expressa em diversos tecidos (Yegutkin, 2008; 2014) e é altamente expressa na maioria dos tumores sólidos, sendo que a sua expressão em linhagens celulares de câncer de bexiga humano já foi descrita. Nestas linhagens celulares, evidências de alterações na atividade enzimática da ecto-5'NT/CD73 com a progressão da malignidade foram observadas, sendo a linhagem de câncer de bexiga de grau 1 (RT4) caracterizada por baixa atividade da enzima em comparação à linhagem de grau 3 (T24) (Stella et al., 2010). Em camundongos saudáveis a ecto-5'NT/CD73 é altamente expressa no músculo liso (Yu et al., 2011). Embora o urotélio normal de camundongos não expresse essa proteína (Yu et al., 2011), recentemente demonstramos a expressão da ecto-5'NT/CD73 no urotélio canceroso em modelo animal de tumor de bexiga induzido por BBN (Rockenbach et al., 2014).

1.2.3.5 Ecto-adenosina desaminase

Além de ser considerada uma enzima citosólica, a adenosina desaminase tem sido encontrada na superfície de diferentes tipos celulares, e, portanto, pode ser considerada também uma ectoenzima (ecto-ADA; EC 3.5.4.4) (Franco et al., 1997). Mesmo não sendo incluída na família das ectonucleotidases, a ecto-ADA é uma importante enzima da cadeia de inativação das purinas. Ela catalisa a reação final de hidrólise de nucleosídeos da adenina, convertendo irreversivelmente a adenosina em inosina. A ecto-ADA é, portanto, a responsável por controlar a disponibilidade de adenosina e a produção de inosina no meio extracelular (Yegutkin, 2008; 2014).

Ao contrário da adenosina, pouca atenção tem sido dada ao papel fisiológico da inosina. Originalmente pensou-se que a inosina não tinha efeitos biológicos, mas

atualmente é bem estabelecido que este nucleosídeo pode participar ativamente em muitos processos biológicos, atuando na proteção celular frente a diversos insultos. A ação da inosina pode envolver efeitos pela ativação direta aos receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} e A_3), mas é também possível que a inosina aumente os níveis de adenosina extracelular por competir com os transportadores de nucleosídeo, gerando assim efeitos secundários pela ligação da adenosina a seus receptores (Haskó et al., 2004).

1.2.3.6 Adenosina cinase

A concentração de adenosina no meio extracelular é mantida em equilíbrio pela formação de inosina via ecto-ADA ou por mecanismos de captação via transportadores específicos. Quando no meio intracelular, a adenosina é fosforilada a AMP pela adenosina cinase (ADK; EC 2.7.1.20). A ADK apresenta baixo valor de K_m e é a principal enzima para depurar a adenosina metabólica com o intuito de manter baixos os níveis do nucleosídeo no meio intracelular (na faixa de nanomolar). Em contrapartida, a ecto-ADA tem alto valor de K_m , auxiliando na depuração metabólica da adenosina quando altos níveis deste nucleosídeo são alcançados (condição patológica) e a capacidade da ADK é excedida (Boison, 2013). Assim como a ecto-ADA, a ADK também não pertence à família das ectonucleotidases.

1.3 Estratégias terapêuticas para patologias da bexiga urinária

Embora diversas modalidades de tratamento tenham sido descritas para a cistite hemorrágica, até o momento não há nenhum tratamento farmacológico adequado (Hsu et al., 2013). Portanto, a identificação de tratamentos eficazes e estratégias preventivas para reduzir a morbidade e a mortalidade associadas a esta patologia são urgentes (Traxer et al., 2001; Manikandan et al., 2010).

Em relação ao câncer de bexiga, frente a vários efeitos colaterais da terapia disponível, bem como a constatação de que por várias décadas o tratamento para esta patologia não obteve avanços, novas abordagens terapêuticas se tornam necessárias. Porém, a melhora no tratamento requer a compreensão detalhada da patologia e biologia molecular do câncer de bexiga *per se*, frente a antigas e novas estratégias terapêuticas (Knowles, Hurst, 2015).

1.3.1 *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.

1.3.1.1 Aspectos botânicos e geográficos

Uncaria tomentosa (Willdenow ex Roemer & Shultes) DC. pertence à família Rubiaceae e é popularmente conhecida como unha-de-gato ou garra-de-gato. A espécie vegetal é uma videira lenhosa, amplamente difundida, distribuindo-se nas florestas tropicais da América do Sul e da América Central (Keplinger et al., 1999; Quintera, Ugaz, 2003; Pollito, Tomazello, 2006). No Brasil, *U. tomentosa* é encontrada nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e, principalmente, no Acre (Pollito, 2004).

1.3.1.2 Aspectos fitoquímicos

A análise dos constituintes químicos das cascas de *U. tomentosa* revela a presença de uma série de metabólitos secundários. Entre eles estão os compostos fenólicos, como flavonoides, derivados fenilpropânicos e taninos; os derivados triterpênicos, representados pelas agliconas e heterosídeos dos ácidos quinóico, ursólico e oleanólico, com uma ou duas cadeias de carboidratos ligadas ao núcleo triterpênico; e os alcaloides, sendo majoritários os oxindólicos e, em menor proporção, os indólicos, ambos divididos em tetracíclicos e pentacíclicos (Keplinger et al., 1999).

1.3.1.3 Aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos

Relatos históricos demonstram que *U. tomentosa* tem sido cultivada por várias gerações indígenas na floresta amazônica (Pollito, Tomazello, 2006). Quanto ao início do emprego desta espécie na medicina indígena Asháninka, na região Amazônica Peruana, este continua incerto (Syrimis, 1998). Cascas e raízes de *U. tomentosa* são amplamente empregadas, sendo administradas como chá, tanto na forma de decocção como de maceração (Keplinger et al., 1999; Sheng et al., 2000; Sandoval et al., 2002). Especialmente no Peru e na região norte do Brasil, a espécie tem sido administrada em casos de dor reumática, artrite, osteoartrite, infecções bacterianas e virais, dores cardíacas, úlceras gástricas, hemorragia, inflamações crônicas, alergias, asma, diarreia, gonorréia, acne, doenças do trato urinário e até mesmo em casos de câncer (Keplinger et al., 1999; Aguilar et al., 2002; Heitzman et al., 2005; Valente, 2006; Hardin, 2007; Allen-Hall et al., 2010). Extratos, cápsulas e comprimidos à base de *U. tomentosa* têm sido introduzidos na Europa e nos Estados Unidos como tratamento adjuvante para o câncer e algumas doenças virais, como a AIDS (Sandoval-Chacón et al., 1998; Sheng et al., 2000).

Diversos estudos relatam diferentes atividades biológicas para extratos, frações e/ou isolados de *U. tomentosa*, demonstrando propriedades citotóxica, contraceptiva, antiproliferativa, antiapoptótica ou pró-apoptótica, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e antimutagênica (Aquino et al., 1989; Rizzi et al., 1993; Sandoval-Chacón et al., 1998; Sheng et al., 2000; De Martino et al., 2006; Allen-Hall et al., 2007; Cheng et al., 2007; Allen-Hall et al., 2010; Dreifuss et al., 2010; Caon et al., 2014).

O potencial antitumoral da espécie *U. tomentosa* é atribuído às três principais frações de metabólitos secundários: polifenóis, alcaloides e derivados triterpênicos (Sheng et al., 1998; Riva et al., 2001; De Martino et al., 2006). O efeito antitumoral da

espécie averiguada para extratos, frações enriquecidas e alcaloides oxindólicos pentacíclicos isolados, foi demonstrada em inúmeros estudos onde diversas linhagens celulares foram utilizadas, tais como linhagem de leucemia mieloide humana (HL-60), linhagem humana de leucemia linfoblástica aguda (CCRF-CEM-C7H2), carcinomas de mama humano (MCF7 e MT-3) e de rato (Walker-256), linhagem de osteossarcoma humano (SAOS), carcinoma cervical humano (HeLa), linhagem de glioma humano (GAMG), neuroblastoma humano (SKN-BE(2)), linhagem celular de carcinoma de tireoide medular humano (MTC-SK), linhagem humana de sarcoma de Ewing's (MHH-ES-1), adenocarcinoma de cólon (HT-29), adenocarcinoma de colorretal humano (SW707), carcinoma epidermoide humano (KB), carcinoma de pulmão de não pequenas células humano (A549), cistoadenocarcinoma de ovário humano (OAW-42), carcinoma de pulmão Lewis de camundongo LL/2 (LLC), linhagem de melanoma de camundongo (B16), linhagens de câncer de bexiga humano (RT4 e T24), dentre outras (Sheng et al., 2005; Bacher et al., 2006; De Martino et al., 2006; Cheng et al., 2007; García Prado et al., 2007; Pilarski et al., 2007; Rinner et al., 2009; Dreifuss et al., 2010; García Giménez et al., 2010; Pilarski et al., 2010; Dreifuss et al., 2013; Kaiser et al., 2013; de Oliveira et al., 2014). A apoptose mediada por caspases parece ser o mecanismo associado à morte destas células tumorais (Bacher et al., 2006; De Martino et al., 2006; Cheng et al., 2007; Rinner et al., 2009). No entanto, um mecanismo alternativo de indução de apoptose parece estar relacionado à capacidade da *U. tomentosa* em inibir a ativação do NF- κ B, o qual depende do tipo celular e do seu *status* de ativação (Allen-Hall et al., 2010). A maioria das atividades descritas acima é atribuída aos alcaloides, os quais representam a classe mais abundante de compostos encontrados nesta espécie (Keplinger et al., 1999; Sandoval et al., 2002). No entanto, a fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico de *U. tomentosa*, ao contrário da fração purificada de alcaloides, demonstrou

potente efeito inibitório frente à linhagem celular de câncer de bexiga humano T24, induzindo morte celular por ativação da via apoptótica dependente de caspase-3 e por modulação do NF- κ B (Dietrich et al., 2014).

Além destes, outros estudos também foram realizados a fim de se investigar a atividade anti-inflamatória relatada para o uso desta espécie na medicina popular. A ação anti-inflamatória *in vitro* foi relacionada à capacidade da espécie *U. tomentosa* em modular o fator transcricional NF- κ B, mediando a secreção diferencial de TNF- α e IL-1 β e, desta forma, promovendo morte celular por apoptose. Conforme dados da literatura, *U. tomentosa* é o primeiro vegetal que de maneira distinta regula a secreção destas duas citocinas pró-inflamatórias, promovendo, via NF- κ B, o aumento de IL-1 β e suprimindo a síntese de TNF- α (Sandoval-Chacón et al., 1998; Sandoval et al., 2000; Aguilar et al., 2002; Sandoval et al., 2002; Akesson et al., 2003; Allen-Hall et al., 2007; Allen-Hall et al., 2010). *In vivo*, efeitos anti-inflamatórios foram observados pela redução do dano celular em brônquios de camundongos, após administração de decoctos (Cisneros et al., 2005); inibição da inflamação intestinal crônica, após administração do extrato aquoso das cascas (Sandoval-Chacón et al., 1998); redução do edema de pata de camundongos e ratos, após administração de extratos hidroalcoólicos e de glicosídeos do ácido quinóico, respectivamente (Aquino et al., 1991; Aguilar et al., 2002); redução da artrite em ratos, após administração de extrato aquoso (Castilhos et al., 2015); inibição de cerca de 50% das interleucinas liberadas (1 α , 1 β , 17 e TNF- α), após administração de mirtafilina (Rojas-Duran et al., 2012); e o mesmo alcaloide oxindólico foi capaz de modular a ativação de neutrófilos de forma a atenuar a resposta inflamatória, além de reduzir a expressão e secreção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-8) (Montserrat-de la Paz et al., 2016). Ainda, no estudo conduzido por Aguilar et al. (2002) foi demonstrado que os extratos aquoso e hidroalcoólico de *U. tomentosa*

promoveram um moderado e fraco efeito inibitório sobre as ciclooxigenases, COX-1 e COX-2, respectivamente, sendo a atividade observada atribuída à presença de alcaloides oxindólicos pentacíclicos. Efeitos antioxidantes também foram evidenciados contra o ácido hipocloroso, um forte oxidante produzido por neutrófilos, podendo justificar a efetividade de *U. tomentosa* no tratamento de doenças inflamatórias e em certos tipos de câncer (Amaral et al., 2009).

C-Med 100[®] (CampaMed, New York, USA) é um extrato padronizado obtido por decocção das cascas de *U. tomentosa*, onde alcaloides, taninos e flavonoides são removidos. Após a suplementação deste extrato aquoso foi demonstrado um aumento no reparo do DNA e na resposta imunológica *in vivo*, enquanto nenhum sinal ou sintoma de toxicidade foi observado nas doses testadas em ratos e humanos (Sheng et al., 2000). Como tratamento adjuvante, o extrato de *U. tomentosa* tem se mostrado seguro e efetivo na redução dos efeitos adversos quimioterápicos, na atenuação da neutropenia e na recuperação acelerada na contagem de leucócitos (Steinberg, 1995; Farias et al., 2012). Em pacientes diagnosticadas com câncer de mama e tratadas com quimioterapia, foi observada recuperação da neutropenia e restauração do dano ao DNA quando cotratadas com o extrato de *U. tomentosa* (Santos Araújo et al., 2012).

1.3.2 Radioterapia

A radioterapia é uma das principais modalidades efetivas para o tratamento de tumores sólidos, sendo utilizada isoladamente ou em combinação com cirurgia e/ou quimioterapia para tratar aproximadamente 50% de todos os pacientes (Begg et al., 2011; Ng et al., 2013; Leroi et al., 2016).

A exposição das células à radiação induz dano ao DNA direta ou indiretamente por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Estas

espécies reativas promovem a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal intracelulares, conduzindo a desregulação da função celular (Valerie et al., 2007; Leroi et al., 2016).

Dano à base, quebra da cadeia simples ou quebra da dupla fita são consideradas formas letais de dano ao DNA. Tais danos, se não reparados, resultam em morte celular ou instabilidade genômica (Begg et al., 2011). Muitos são os fatores que influenciam na morte celular que pode ocorrer após a radiação. Entre estes fatores, estão incluídos o tipo e a dose da radiação, o tipo e o microambiente tumoral e as características imunológicas do hospedeiro (Formenti, Demaria, 2009; Sologuren et al., 2014). No entanto, danos ao DNA podem ser reparados por recombinação homóloga ou união da extremidade não homóloga (Wang, Lees-Miller, 2013).

A inespecificidade da radioterapia constitui um dos maiores problemas desta terapia, pois atinge tanto células tumorais quanto normais do hospedeiro (Valerie et al., 2007; Leroi et al., 2016). Moléculas de sinalização liberadas pela radiação tais como ROS, RNS e citocinas, induzem vários efeitos biológicos não somente nas células irradiadas, mas também nas células e tecido não irradiados por meio da comunicação intercelular denominada de efeito *bystander* (Hamada et al., 2007; 2011).

1.3.2.1 Radioterapia no câncer de bexiga

Apesar da crescente pesquisa, os principais tratamentos para tumor de bexiga músculo invasivo, ainda continuam sendo a cistectomia radical e a radioterapia. A cistectomia é considerada o tratamento padrão para tumor de bexiga músculo invasivo, mas este tratamento está associado com significativa morbidade e uma taxa de complicação que varia de 25 a 57% nos primeiros 30 dias após a cirurgia. Mesmo após a realização da cistectomia radical, a taxa de mortalidade em 5 anos é em torno de 50%

a 70%. O reconhecimento da falha no tratamento e a busca por uma melhor qualidade de vida dos pacientes têm aumentado o interesse por abordagens terapêuticas que visam à preservação da bexiga, sem comprometimento na sobrevivência (Stein et al., 2001; Grossman et al., 2003; Kotwal et al., 2008; Jacobs et al., 2010; James et al., 2012). Neste sentido, tratamentos combinados incluindo a ressecção transuretral, a quimioterapia e a radioterapia têm sido reconhecidos como terapias para preservação do órgão, com resultados promissores em pacientes cuidadosamente selecionados, cuja sobrevivência foi comparável a cistectomia radical (5 anos em 50% dos casos) (Chen et al., 2013; Park et al., 2014; Chen, 2015).

Na busca por tratamentos que preservem a bexiga urinária, a radioterapia é uma modalidade de tratamento adequado. No entanto, apesar de a radioterapia ser utilizada para tratamento de pacientes com câncer de bexiga, muitos tumores apresentam resistência sob a forma de recorrência e metástases à distância, dificultando a implementação desta terapia (Kotwal et al., 2008, James et al., 2012). Portanto, a elucidação dos mecanismos, bem como a identificação de biomarcadores que conduzem a radiosensibilização das células do câncer de bexiga torna-se imprescindível para obtenção de resultados promissores frente a pacientes selecionados que respondam a terapia da radiação.

A radiorresistência observada em pacientes, também tem sido evidenciada em linhagens de câncer de bexiga. A linhagem de câncer de bexiga humano T24 tem sido descrita como radiorresistente a baixas doses (<2 Gy) e radiosensível a altas doses (>4 Gy) (Price et al., 2000). Esta radiosensibilidade também foi evidenciada no estudo conduzido por Hinata et al. (2003) que demonstrou que a dose de 4 Gy promove parada na fase G2/M do ciclo celular e não induz morte apoptótica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento da sinalização purinérgica frente a estratégias terapêuticas em dois modelos experimentais de patologia da bexiga urinária: cistite hemorrágica e câncer de bexiga.

2.2 Objetivos específicos

Capítulo 1: Avaliar *in vivo*, o efeito da fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico da espécie *Uncaria tomentosa* nos eventos nociceptivos e inflamatórios em modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (item 3.1).

Capítulo 2: Caracterizar a expressão dos receptores purinérgicos e determinar a participação dos mesmos no efeito desencadeado pela radiação em cultura de linhagem de células de câncer de bexiga humano T24 (item 3.2).

Capítulo 3: Investigar o envolvimento das ectonucleotidases sobre o efeito desencadeado pela radiação em cultura de linhagem de células de câncer de bexiga humano T24, no intuito de elucidar as vias celulares envolvidas (item 3.3).

Capítulo 4: Avaliar o potencial efeito inibitório de 14 moléculas frente à enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 purificada e investigar o efeito do ácido ursólico frente à cultura de linhagem de células de câncer de bexiga humano T24 (item 3.4).

3. RESULTADOS

3.1 Capítulo 1

THE QUINOVIC ACID GLYCOSIDES PURIFIED FRACTION FROM *Uncaria tomentosa* PROTECTS AGAINST HEMORRHAGIC CYSTITIS INDUCED BY CYCLOPHOSPHAMIDE IN MICE

Fabírcia Dietrich, Jerônimo Pietrobon Martins, Samuel Kaiser, Rodrigo Braccini Madeira Silva, Liliana Rockenbach, Maria Isabel Albano Edelweiss, George González Ortega, Fernanda Bueno Morrone, Maria Martha Campos, Ana Maria Oliveira Battastini.

Periódico: **PLOS ONE**

Status: **Publicado**

RESEARCH ARTICLE

The Quinovic Acid Glycosides Purified Fraction from *Uncaria tomentosa* Protects against Hemorrhagic Cystitis Induced by Cyclophosphamide in Mice

Fabrcia Dietrich¹, Jerônimo Pietrobon Martins³, Samuel Kaiser⁴, Rodrigo Braccini Madeira Silva^{3,5}, Lilliana Rockenbach¹, Maria Isabel Albano Edelweiss⁶, George González Ortega⁴, Fernanda Bueno Morrone^{3,5}, Maria Martha Campos^{5,7}, Ana Maria Oliveira Battastini^{1,2*}

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil, 2 Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil, 3 Laboratório de Farmacologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil, 4 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil, 5 Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil, 6 Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil, 7 Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

* abattastini@gmail.com



 OPEN ACCESS

Citation: Dietrich F, Pietrobon Martins J, Kaiser S, Madeira Silva RB, Rockenbach L, Albano Edelweiss MI, et al. (2015) The Quinovic Acid Glycosides Purified Fraction from *Uncaria tomentosa* Protects against Hemorrhagic Cystitis Induced by Cyclophosphamide in Mice. PLoS ONE 10(7): e0131882. doi:10.1371/journal.pone.0131882

Editor: Udai P. Singh, University of South Carolina School of Medicine, UNITED STATES

Received: January 10, 2015

Accepted: June 8, 2015

Published: July 8, 2015

Copyright: © 2015 Dietrich et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available in the manuscript and its Supporting Information.

Funding: This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), in addition to a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) research grant "Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS" (PUCRSINFRA) #01.11.0014-

Abstract

Uncaria tomentosa is widely used in folk medicine for the treatment of numerous diseases, such as urinary tract disease. Hemorrhagic cystitis (HE) is an inflammatory condition of the bladder associated with the use of anticancer drugs such as cyclophosphamide (CYP). Sodium 2-mercaptoethanesulfonate (Mesna) has been used to prevent the occurrence of HE, although this compound is not effective in established lesions. It has been demonstrated that the purinergic system is involved in several pathophysiological events. Among purinergic receptors, P2X7 deserves attention because it is involved in HE induced by CYP and, therefore, can be considered a therapeutic target. The objective of this study was to investigate the potential therapeutic effect of the quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) from *U. tomentosa* in the mouse model of CYP-induced HE. Pretreatment with QAPF not only had a protective effect on HE-induced urothelial damage (edema, hemorrhage and bladder wet weight) but was also able to control visceral pain, decrease IL-1 β levels and down-regulates P2X7 receptors, most likely by inhibit the neutrophils migration to the bladder. This research clearly demonstrates the promising anti-inflammatory properties of QAPF, supporting its use as complementary therapy. QAPF represents a promising therapeutic option for this pathological condition.

00. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Uncaria tomentosa (Willd.) DC. belongs to the Rubiaceae family, commonly known as “uña de gato” or “cat's claw” due to its curved hooks [1]. For centuries, decoctions of its bark and roots have been used by the Asháninkas people [1, 2, 3]. Particularly in traditional Peruvian medicine, preparations of *U. tomentosa* have been used for the treatment of gastric ulcers, arthritis, viral infections, general inflammatory conditions, urinary tract disease, and cancer [1, 3]. In addition, dietary supplements obtained from *U. tomentosa* bark have been widely used as adjunctive therapies for the treatment of inflammatory diseases [4, 5]. The wide range of activities conferred to *U. tomentosa* is mostly attributed to the presence of three main fractions of secondary metabolites: polyphenols, alkaloids and quinovic acid glycosides [3]. *U. tomentosa* decoctions have demonstrated an anti-inflammatory potential by preventing or modulating lung injury induced by ozone in vivo [6]. For example, hydroalcoholic extracts of *U. tomentosa* and quinovic acid glycoside were able to decrease carrageenan-induced paw edema in mice and rats, respectively [7, 8]. Although the mechanisms by which *U. tomentosa* exerts anti-inflammatory activity remain unclear, its biological actions are likely related to the modulation of TNF synthesis, via NF- κ B inhibition [2, 9, 10, 11]. However, no study has evaluated the anti-inflammatory effect of *U. tomentosa* against hemorrhagic cystitis (HE).

HE is a general inflammatory condition of the urinary bladder [12] characterized by intense pain, edema, bleeding, ulceration, necrosis, and leukocyte infiltration [13]. HE is usually associated with the use of the anticancer drug cyclophosphamide (CYP) [12]. The incidence of HE is correlated with the CYP dosage and can be higher than 75% [14]. The urological side effects of CYP are mediated by the metabolite acrolein, which is able to induce severe toxicity by direct contact with the urothelium and by evoking a marked inflammatory reaction [12, 15]. Sodium 2-mercaptoethanesulfonate (Mesna) is prophylactically administered to patients treated with CYP because this compound binds to acrolein, reducing harm to the bladder [15]. However, Mesna has no effectiveness in established lesions, as morbidity due to HE continues to increase [13, 16, 17]. The involvement of purinergic signaling in the physiology of the urinary bladder has been extensively studied [18], with special focus on malignancies of the genitourinary tract [19]. Extracellular purines and pyrimidines exert different effects by interacting with purinoreceptors P1 and P2. The P2 receptors are divided into two families, P2Y and P2X [20]. Among the P2X receptors, P2X7 has demonstrated an important role in the cystitis hemorrhagic model induced by CYP. It was shown that the pharmacological blockade or genetic deletion of this receptor reduced the nociceptive and inflammatory events associated with HE [21]. Thus, the association of the P2X7 receptor (P2X7R) with inflammation observed in HE becomes a possible target for the treatment of this disease.

Therefore, considering the numerous pharmacological properties attributed to *U. tomentosa* and the results already obtained on the anti-inflammatory activity of this species, the present study aimed to investigate the potential therapeutic effect of the quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) obtained from *U. tomentosa* stem bark in a mouse model of CYP-induced HE. The involvement of the P2X7R in the anti-inflammatory effect of QAPF on HE induced by CYP was also investigated. In this study, QAPF from *U. tomentosa* reduces nociceptive and inflammatory events mediating their effects by a mechanism that involves the reduced migration of neutrophils, and as consequence of this, down-regulation of its P2X7R and the decrease of IL-1 β levels in the urinary bladder. Thus, QAPF may be deemed promising for the prevention or treatment of this disease.

Materials and Methods

Chemicals

Cyclophosphamide (Genuxa1@200) and Mesna (Mitexan) were obtained from Baxter Oncology GmbH (Frankfurt, Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO), tetramethylbenzidine (TMB) and hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). NaCl, NaPO₄, hydrogen peroxide and Tween 20 were obtained from Merck (Haar, Germany). BSA Fraction V (7.5%) was obtained from Gibco (Grand Island, NY, USA). ELISA kits for quantifying cytokine levels were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

Ethics statement

All experimental procedures used in the present study were performed in accordance with the Guidelines for the Use and Care of Laboratorial Animals from National Institute of Health publication No. 85–23 and ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animal. The protocols were approved by the Ethics Committee of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA 11/00243). The number of animals and the intensity of noxious stimuli were the minimum required to demonstrate consistent effects of the drug treatment.

Animals

Male Swiss mice (25 to 30 g) were housed in groups of five per cage and kept under conditions of optimum light (12 h light/dark cycle), controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity (60–70%), with food and water *ad libitum*. Except in behavioral studies, the experiments were performed between 8:00 AM and 6:00 PM. At least 1 h before the start of the experiments, the animals were acclimatized in the laboratory. The number of animals used in each experiment is provided in the legend of the figures.

Obtaining the purified fraction

Stem bark of *U. tomentosa*, supplied by Laboratorios Induquímica S.A., (Lima, Peru) collected in Ucayali (Peru) and botanically certified by Peruvian biologist José Ricardo Campos de La Cruz (Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru), were used in the present study. The quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) was obtained and suitably characterized by HPLC-PDA and UPLC/Q-TOF-MS analysis, as previously described [22, 23]. All samples were properly concentrated and freeze-dried.

Hemorrhagic cystitis induction and dose treatment schedule

Hemorrhagic cystitis was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of CYP (300 mg/kg) [21]. The animals received two administrations of the following substances: the reference compound Mesna (60 mg/kg, i.p.) or QAPF (20, 50 and 100 mg/kg, i.p.); the first dose was given 30 min prior to CYP, and the subsequent dose was administered 4 h after the injection of CYP, except in the experiments for assessing cytokines, in which the drugs were administered as a single i.p. dose 30 min prior to CYP. CYP and Mesna were diluted in 0.9% NaCl. The purified fraction from *U. tomentosa* was prepared in 3% DMSO diluted with sterile water. The control groups received vehicle solutions: 3% DMSO plus saline (control group) or purified fraction plus saline (drug control) at the same schedules of administration (Table 1). The doses of the

Table 1. Detailed scheme of the treatment groups.

Group	Dose (mg/kg)	Dose schedule	Administration route
DMSO 3% + Saline	—	30 min prior; 4 h after Saline/ at 30 min	i.p. ^a
DMSO 3% + CYP ^b	— + 300	30 min prior; 4 h after CYP/ at 30 min	i.p.
QAPF ^c + Saline	20 or 100 + —	30 min prior; 4 h after Saline/ at 30 min	i.p.
Mesna ^d + CYP	60 + 300	30 min prior; 4 h after CYP/ at 30 min	i.p.
QAPF + CYP	20, 50 or 100 + 300	30 min prior; 4 h after CYP/ at 30 min	i.p.

Detailed scheme of hemorrhagic cystitis induction and treatment schedule of the groups.

^ai.p. = intraperitoneal

^bCYP = cyclophosphamide

^cQAPF = quinovic acid glycosides purified fraction

^dMesna = Sodium 2-mercaptoethanesulfonate

doi:10.1371/journal.pone.0131882.t001

fraction were chosen on the basis of literature data [1, 8, 24]. Each group consisted of at least three animals.

The animals were killed by cervical dislocation 6 h following CYP administration, and the bladders were collected for macroscopic and histological analyses, as described below.

Behavioral studies—nociceptive response

To minimize the potential circadian variations in behavioral responses, the experiments were performed between 8:00 and 12:00 AM. Immediately after i.p. CYP administration, mice were housed in individual plastic cages without sawdust, and the spontaneous behavior was measured for 2 min, every 30 min, during a total period of 4 h. The following behavioral changes were evaluated: (i) activity (walking, rearing, climbing, grooming); (ii) immobility; and (iii) behaviors indicative of visceral pain ('crises'). In addition, the behavioral alterations were scored according to the following scale: 0 = normal; 1 = piloerection; 2 = strong piloerection; 3 = labored breathing; 4 = licking of the abdomen; or 5 = stretching and contractions of the abdomen [21]. The nociceptive responses were provided as the sum of the total score.

Assessment of visceral sensitivity using von Frey filaments

Hyperalgesia is characterized by an enhanced abdominal sensitivity due to irritation and/or inflammation in the pelvic viscera and is evaluated by mechanical stimulation with von Frey filaments on the lower abdominal/pelvic area [25]. The animals were placed individually in chambers with a wire mesh floor (mouse acclimation period was 30 min before behavioral testing). Mice were tested one day before (baseline) and 1.5 h after the HE induction. Frequency of withdrawal responses was tested using a 0.4 g von Frey monofilament (Stoelting, USA). The filament was applied vertically on the lower abdominal/pelvic area on mice with a pressure high enough to bend the filament. Some criteria were described as follows: i) lower abdominal/pelvic area withdrawal was considered when the animal completely removed the area; ii) each animal was stimulated for 1–2 s for a total of 10 applications; iii) each withdrawal was recorded as 10% of response; and iv) stimulation was confined to the lower abdominal area in the general vicinity of the bladder. Different areas within this region were stimulated to avoid desensitization.

Bladder gross evaluation and wet weight determination

The animals were killed 6 h following CYP administration, and the gross evaluation of the bladder was based on criteria previously established [26]. All bladders were dissected free of

connective tissues and transected at the bladder neck. An examiner blind to the experimental groups macroscopically evaluated each bladder. The bladders were evaluated for bleeding in the walls and were categorized into four designations considering (3) the presence of intravesical clots; (2) mucosal hematomas; (1) telangiectasia or dilatation of the bladder vessels; and (0) normal aspect. The edema formation was classified as (3) severe, when fluid was observed externally and internally in the walls of the bladder; (2) moderate, when the edema was confined to the internal mucosa; (1) mild, when slight edematogenic signals were observed; and (0) absent, when the bladder was normal. As an additional measure of bladder edema, the wet weight of each bladder was recorded and expressed as grams per 100 g of animal.

Histological analysis

After 6 h of treatment, the animals were killed, and the bladders were removed and fixed in buffered formalin solution (10%) for 24 h. Subsequently, the fixed tissue samples embedded in paraffin were stained with hematoxylin and eosin, and a pathologist performed the pathological analysis of the slides in a blinded manner. As proposed by Gray *et al.* [26], the following parameters were considered: normal (normal urothelium, no inflammatory cell infiltrate or ulcers); mild (diminished urothelial cells, flattening with submucosal edema, mild hemorrhage, few ulcerations); moderate (mucosal erosion, inflammatory cell infiltrate, fibrin deposition, hemorrhage, and multiple ulcerations); and severe (mucosal erosion, inflammatory cell infiltrate, fibrin deposition, multiple ulcerations, and transmural hemorrhage with severe edema). In addition, the histological alterations were scored according to the following scale: 1 = normal urothelium; 2 = diminished urothelial cells; 1 = no inflammatory cell infiltrate; 2 = presence of inflammatory cell infiltrate; 1 = no ulcers; 2 = few ulcerations; 3 = multiple ulcerations; 1 = no edema; 2 = mild edema; 3 = severe edema; 1 = no hemorrhage; 2 = mild hemorrhage; 3 = severe hemorrhage; 1 = no fibrin deposition; 2 = fibrin deposition. The maximum score to be obtained was 15.

Myeloperoxidase (MPO) activity

Neutrophil recruitment to mouse bladder was measured by means of tissue MPO activity according to a reported method [27]. After 6 h of CYP administration, the bladders of Swiss mice were removed, homogenized (5% EDTA/NaCl buffer, pH 4.7) and centrifuged at 2700×g for 15 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 0.5% HTAB buffer (pH 5.4), and the samples were centrifuged again; the supernatant (25 µL) was used in the MPO assay. The enzymatic reaction was assessed with 1.6 mM TMB, 80 mM NaPO₄ and 0.3 mM H₂O₂. The absorbance was measured at 595 nm, and the results are expressed in optical density per grams of tissue.

Determination of cytokine levels

Saline, Mesna and QAPF were administered to the animals as a single i.p. dose, 30 min prior to CYP. As the increase in IL-1β levels peaked 4 h following CYP administration, this time interval was adopted in this experiment. Therefore, after 4 h, the animals were killed, and their bladders were collected. Tissues were homogenized (PBS containing 0.05% Tween-20, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU aprotinin A), centrifuged at 3000×g for 10 min and stored at -70 °C for later measurement of IL-1β levels, according to the protocol described previously [21].

Immunohistochemistry for P2X7 receptor

Expression of the P2X7 purinergic receptor in bladder tissue was evaluated by immunohistochemical analysis. For this experiment, the bladders were collected 6 h after hemorrhagic cystitis induction. The expression of P2X7 receptors was determined using the rabbit anti-P2X7 receptor (extracellular) polyclonal antibody (1:200; catalogue number APR-008, Alomone, Jerusalem, Israel). The secondary antibody used was rabbit anti-mouse secondary antibody (REVEAL Biotin-Free Polyvalent HRP; catalogue number SPB-999, Spring Bioscience Corporation, CA, USA). The bladder submucosal layer was selected with a region of interest and the mean of P2X7R-immunoreactive cells was acquired in number by Image J Software. Images were quantified by counting 10 pictures obtained of each slide per mouse, which was defined to be enough to capture almost all tissue. With the mean of P2X7R-immunoreactive cells, the statistical analysis comparing control, CYP and QAPF treatment was performed. These images were captured by optical microscope (Nikon Eclipse TE 300) and quantified by two people blinded to the study. Also, these images were analyzed by a pathologist blinded to the experimental data.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$.

Results

QAPF decreases CYP-induced nociceptive behavior

Mice treated with CYP (300 mg/kg) displayed significant behavioral changes compared to control mice, which can be associated with development of pelvic pain related with CYP-induced HE (Fig 1). A reduction in CYP-induced nociceptive changes occurred with QAPF treatment throughout the evaluation, with an efficacy comparable to the reference compound Mesna (Fig 1A). It is important to note that QAPF-treatment caused a significant inhibition of the nociceptive responses near the end of the 4-h period (Fig 1B). QAPF alone (20 mg/kg) did not cause significant changes in the nociceptive behavioral score of the animals (Fig 1A).

To confirm the effects of QAPF on nociception, we evaluated visceral sensitivity using von Frey filaments. Fig 2 summarizes the frequency of responses to von Frey filament stimulation of the lower abdominal area one day before and 1.5 h after HE induction. We observed that after the injection of CYP, mice became more sensitive to the filament and the response frequency reached almost 50% using a 0.4 g von Frey filament. Moreover, mice treated with QAPF presented a similar profile regarding behavior nociceptive score (Fig 1B) and visceral sensitivity (Fig 2) when compared to CYP-mice, suggesting that QAPF was able to inhibit hypersensitivity in the pelvic area, which may lead to reduced abdominal discomfort and/or pelvic pain. Furthermore, none of the treatments produced significant changes in locomotor parameters in the open-field arena (S1 Fig).

QAPF decreases hemorrhage and edema caused by CYP

As shown in Fig 3, the i.p. administration of CYP (300 mg/kg) resulted in serious bladder damage, including severe hemorrhage and edema when compared to the saline group, as previously shown [21, 26]. According to the macroscopic evaluation of the bladder, the reference compound Mesna (60 mg/kg) caused a significant inhibition of the hemorrhage (Fig 3A) and of the

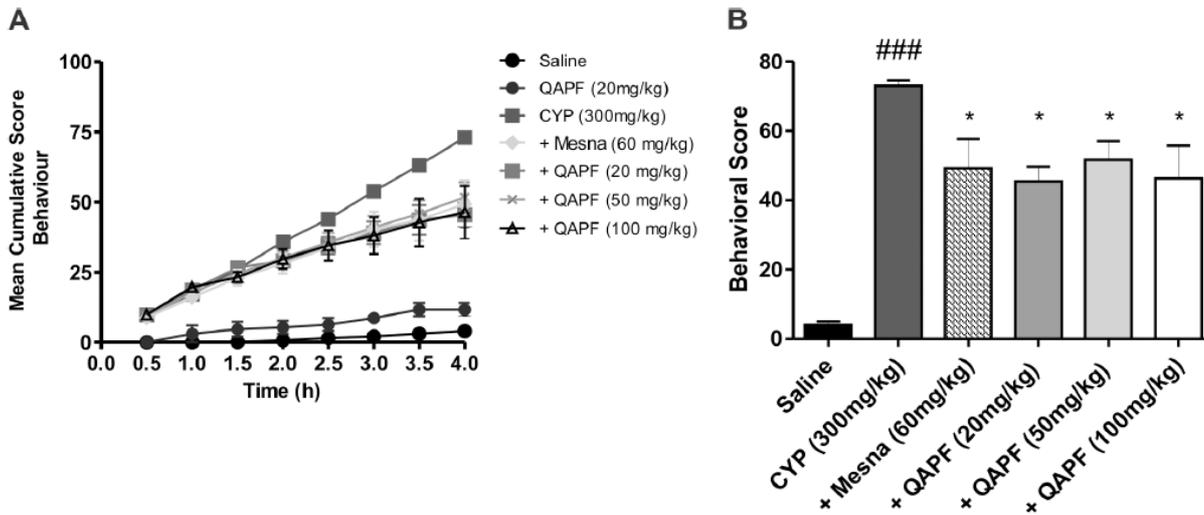


Fig 1. Behavioral scores, assigned at 30-min intervals, over 4 h after injection of cyclophosphamide. (A) Time-course of behavioral scores was plotted as the cumulative score assigned at 30-min intervals during 4 h, after the injection period of different treatments for the nociceptive response in CYP-induced hemorrhagic cystitis in mice. (B) Effect of treatment with Mesna or QAPF from *Uncaria tomentosa* on the nociceptive response after 4 h. The nociceptive responses were provided as described in Materials and Methods. Each column represents the mean of at least 5 animals, and the vertical lines show the SEM. ### $p < 0.001$ denotes the significance levels compared to saline values; * $p < 0.05$ denotes the significance levels compared to CYP values. +Mesna represents CYP+Mesna; +QAPF represents CYP+QAPF.

doi:10.1371/journal.pone.0131882.g001

edema (Fig 3B) induced by CYP. Treatment with QAPF was also able to markedly inhibit the formation of hemorrhage and edema after CYP application (Fig 3A and 3B, respectively).

CYP-induced edema was also evaluated by determining the weight of the empty bladder per 100 g of body weight. Consistently with our findings from the macroscopic evaluation

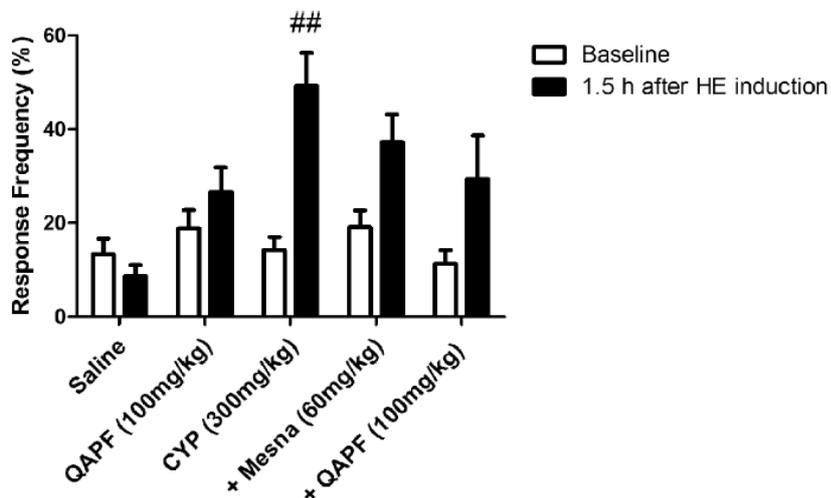


Fig 2. Effect of treatment with Mesna or QAPF from *Uncaria tomentosa* on the development of visceral sensitivity. The visceral sensitivity was measured by the frequency of responses to von Frey filament testing in the lower abdominal area one day before (baseline) and 1.5 h after the HE induction. Each column represents the mean of at least 8 animals, and the vertical lines show the SEM. ## $p < 0.01$ denotes the significance levels compared to saline values. +Mesna represents CYP+Mesna; +QAPF represents CYP+QAPF.

doi:10.1371/journal.pone.0131882.g002

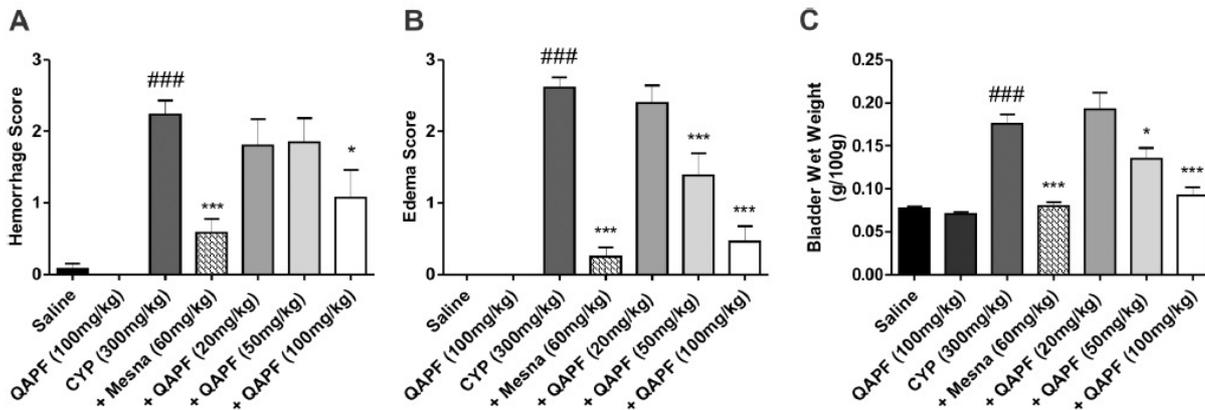


Fig 3. Effect of treatment with Mesna or QAPF from *Uncaria tomentosa* on macroscopic evaluation of the bladder. The (A) hemorrhage, (B) edema, and (C) wet bladder weight was evaluated in CYP-induced hemorrhagic cystitis in mice. In graphics A–C, each column represents the mean of 12–13 animals, except for +QAPF 20 mg/kg, in which five animals were used. The vertical lines show the SEM. ###*p*<0.001 denotes the significance levels compared to saline values; **p*<0.05; ****p*<0.001 denotes the significance levels compared to CYP values. +Mesna represents CYP+Mesna; +QAPF represents CYP+QAPF.

doi:10.1371/journal.pone.0131882.g003

indicating bladder edema, the wet bladder weight was increased after CYP administration (Fig 3C and Table in S1 Table). Regarding the effects of QAPF, the results of the bladder weight assay were in agreement with the data obtained for the reduction of edema (Fig 3B), demonstrating that with 100 mg/kg QAPF, the bladder weights from treated animals were similar to those of animals treated with Mesna (Fig 3C and S1 Table). Furthermore, no change was observed in the bladder of the animals when they were treated with QAPF alone at 20 mg/kg (S1 Table) or at 100 mg/kg (Fig 3A, 3B and 3C). Based on these results, we chose to examine a QAPF dose of 100 mg/kg in the following experiments.

QAPF partially reduces the histological changes induced by CYP

CYP administration resulted in severe bladder damage, including the loss of urothelium, the presence of inflammatory cell infiltration, the presence of much ulceration, fibrosis, a severe degree of edema and hemorrhage (Fig 4C). Treatment with QAPF produced a partial, but not significant, reduction in the histological characteristics of hemorrhagic cystitis. We observed a partial recovery of urothelium, lesser inflammatory cell infiltrate, fewer mucosal ulceration and fibrosis, and mild to moderate edema and hemorrhage (Fig 4E). Animals that were treated with Mesna (60 mg/kg) exhibited characteristics close to those of normal animals, with mild edema and few ulcerations (Fig 4D), resulting in representative histopathological scores (Fig 4F). No significant changes were observed in mice treated with saline (Fig 4A) or QAPF alone (Fig 4B).

QAPF reduces MPO activity

The massive migration of neutrophils is also a feature of cystitis induced by CYP administration, as indicated by the increase of MPO activity in the bladder tissue when compared to that of the saline group. This increase of MPO activity levels detected in the bladder tissues of mice treated with CYP was significantly reduced by the treatment with Mesna and QAPF (Fig 5).

QAPF decreases the cytokine levels of IL-1β in the bladder

The hemorrhagic cystitis induced by CYP administration was also associated with a marked increase of cytokine IL-1β. Levels of IL-1β in the bladder tissue of animals treated with QAPF

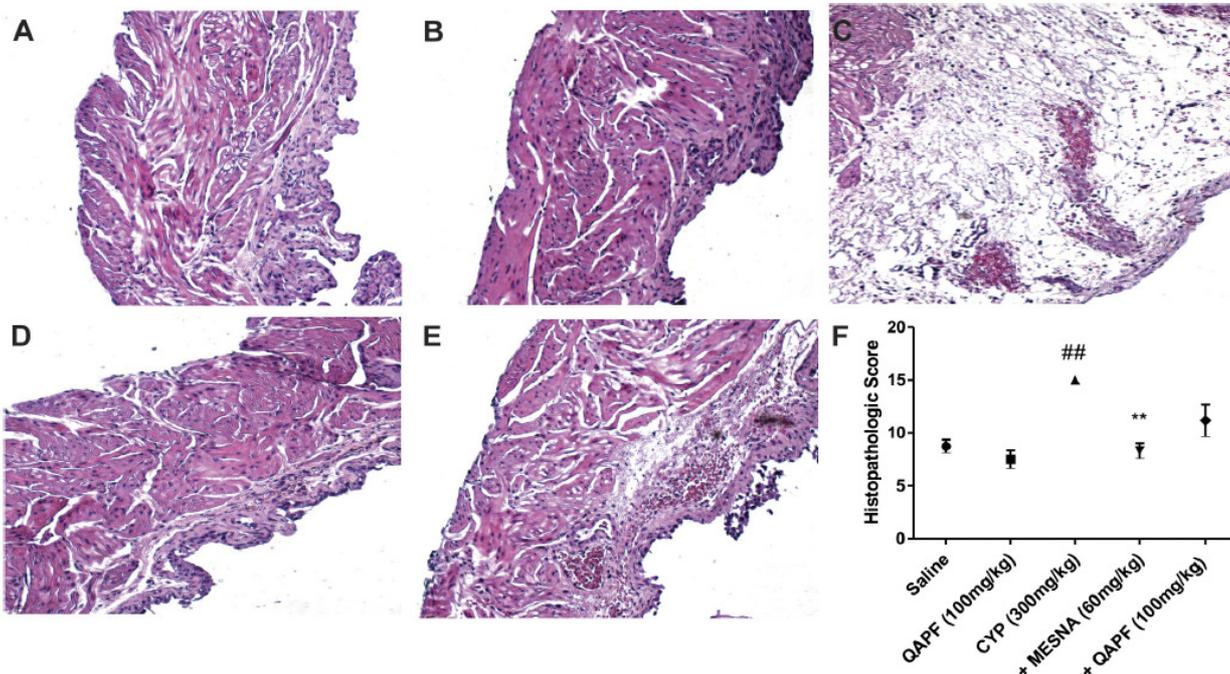


Fig 4. Representative images of histological evaluations using hematoxylin and eosin. (A) Saline groups; (B) animals treated with QAPF only; (C) CYP groups; (D) animals treated with Mesna before and after CYP administration; (E) animals treated with QAPF before and after CYP administration. Original magnification $\times 40$ in all panels. (F) Histopathologic alterations were scored as described in the Materials and Methods. Each column represents the mean of at least 4 animals, and the vertical lines show the SEM. $##p < 0.01$ denotes the significance levels compared to saline values; $**p < 0.01$ denotes the significance levels compared to CYP values. +Mesna represents CYP+Mesna; +QAPF represents CYP+QAPF.

doi:10.1371/journal.pone.0131882.g004

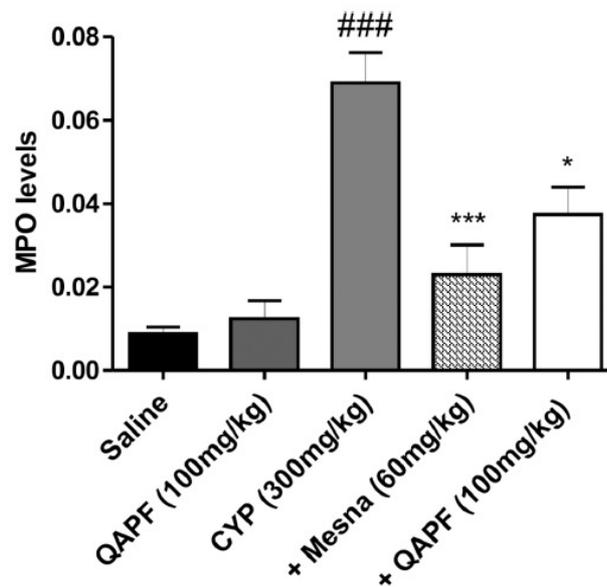


Fig 5. Effect of treatment with Mesna or QAPF from *Uncaria tomentosa* on MPO activity. Each column represents the mean of at least 3 animals, and the vertical lines show the SEM. $###p < 0.001$ denotes the significance levels compared to saline values; $*p < 0.05$; $***p < 0.001$ denotes the significance levels compared to CYP values. +Mesna represents CYP+Mesna; +QAPF represents CYP+QAPF.

doi:10.1371/journal.pone.0131882.g005

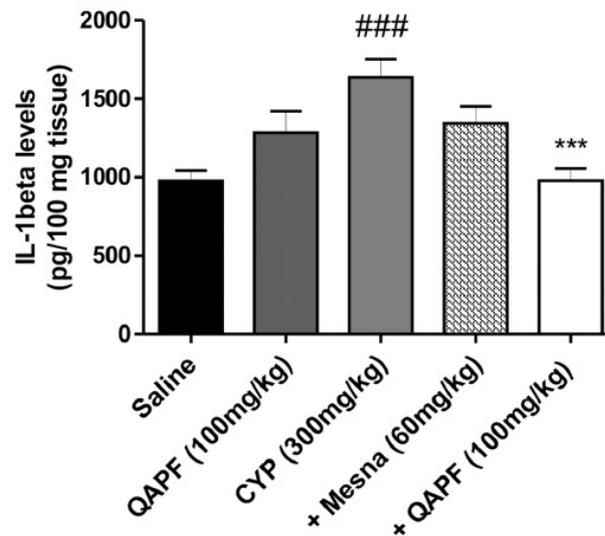


Fig 6. Effect of treatment with Mesna or QAPF from *Uncaria tomentosa* on the generation of IL-1 β . Each column represents the mean of at least 8 animals, and the vertical lines show the SEM. ### $p < 0.001$ denotes the significance levels compared to saline values; *** $p < 0.001$ denotes the significance levels compared to CYP values. +Mesna represents CYP+Mesna; +QAPF represents CYP+QAPF.

doi:10.1371/journal.pone.0131882.g006

were significantly lower than those observed in non-treated CYP mice bladders, reaching values that were similar to those measured in the saline group. In this assay, Mesna did not cause any significant effect on IL-1 β levels (Fig 6).

QAPF prevents the increased expression of P2X7 receptors induced by CYP

As shown in Fig 7A, bladder P2X7R expression of CYP-treated animals was increased when compared with that of saline-treated mice. Interestingly, QAPF treatment prevented the increased expression of P2X7R induced by CYP. Fig 7B shows a representative image of P2X7R immunoreactivity in urothelial and submucosal layers of saline-treated mice. The immunoreactivity for P2X7R was markedly increased in the bladder submucosal layer of CYP-treated mice (Fig 7C), whereas the treatment with QAPF promoted a decreasing in the immunoreaction in this layer (Fig 7D). The decreased immunoreaction for P2X7R promoted by QAPF treatment might be due to the diminished neutrophils migration as is indicated by MPO assay (Fig 5). In addition, it is possible to observe that the bladder of mice treated with QAPF presented preserved urothelial cells with immunoreactivity to P2X7R (Fig 7D).

Discussion

In cases of chronic inflammation and urinary tract diseases, decoctions containing the bark of *Uncaria tomentosa* have been widely used in traditional medicine [1, 2, 3]. These properties attributed to *U. tomentosa* encouraged us to investigate the potential effects of its quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF), in nociceptive and inflammatory events in a model of hemorrhagic cystitis (HE) induced by cyclophosphamide (CYP) in mice. In this experimental model, widely used to evaluate visceral pain [21, 28], the systemic treatment of mice with QAPF clearly prevented the development of nociceptive behavior induced by CYP (Fig 1) and decreased the visceral sensitivity in the pelvic area (Fig 2) with an efficacy comparable to the

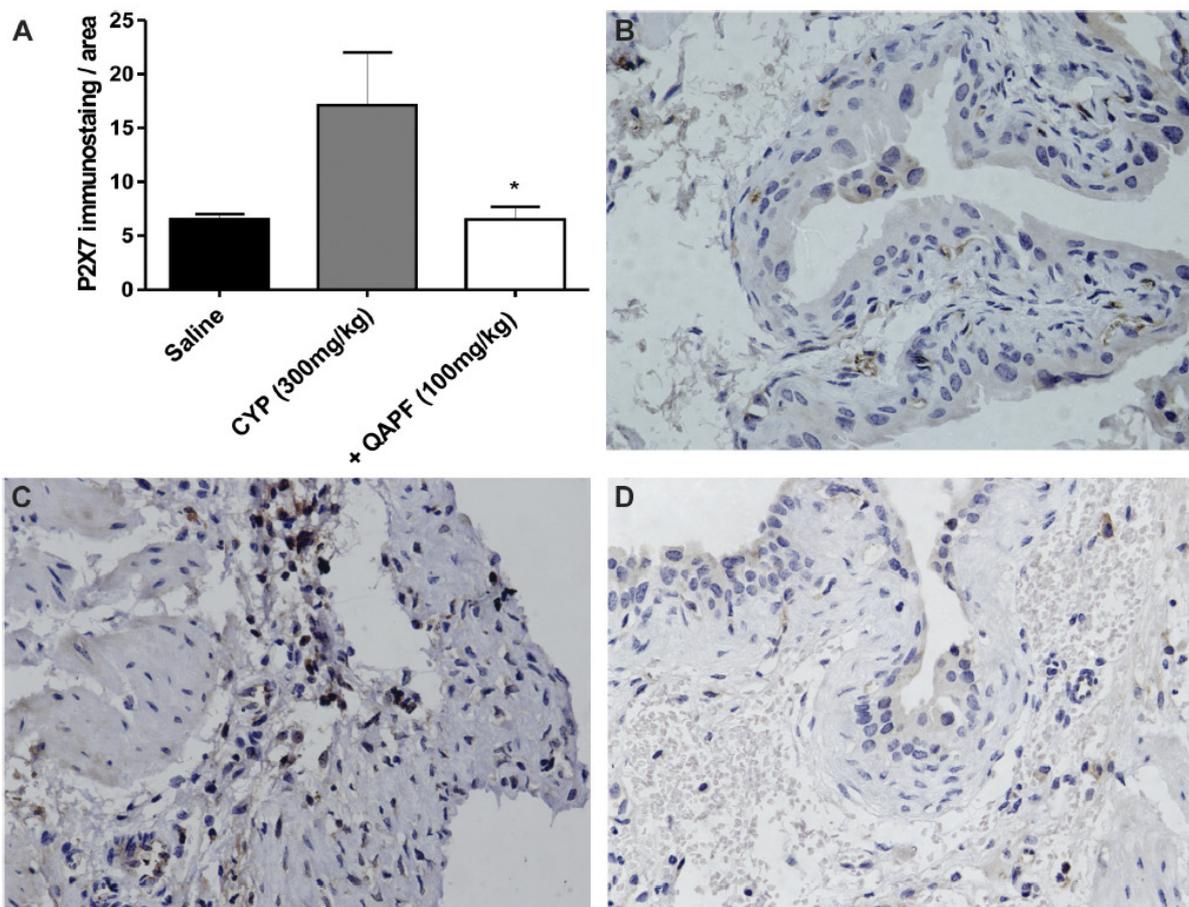


Fig 7. Effect of treatment with QAPF from *Uncaria tomentosa* on P2X7 receptor expression in mouse bladder layers. (A) Each column represents the mean of at least 3 animals, and the vertical lines show the SEM. * $p < 0.05$ denotes the significance levels compared to CYP values. Representative images demonstrate low immunostaining for the P2X7 receptor in animals treated with (B) saline, whereas the immunoreaction for this receptor was markedly enhanced in the bladder submucosal layer of mice treated with (C) CYP; P2X7 was markedly decreased in mice treated with (D) QAPF from *Uncaria tomentosa*. Original magnification $\times 40$ in all panels. +QAPF represents CYP+QAPF.

doi:10.1371/journal.pone.0131882.g007

reference compound Mesna. Noteworthy, the antinociceptive actions reported to QAPF do not change the general locomotor activity, suggesting that the antinociceptive actions do not appear to involve central effects (S1 Fig). These data suggest the application of QAPF as a potential therapeutic approach to control visceral pain induced by CYP and may justify the traditional medicinal use of *U. tomentosa* in relieving inflammation.

CYP-induced toxicity is mainly attributed to the metabolite acrolein that can cause sub-epithelial edema, ulceration, neovascularization, hemorrhage and necrosis when in direct contact with the urothelium, as previously demonstrated in rodent models [15]. A single administration of CYP causes extensive damage to the urothelium and promotes increases of both edema and hemorrhage [13, 21]. Notably, the pretreatment with the highest dose of QAPF consistently showed a significant reduction of hemorrhage, edema and gross bladder weight in mice, similar to the effects of the reference compound Mesna (Fig 3A, 3B and 3C). These results are consistent with the histological analysis, although in the histological score, the QAPF-treatment partially reduced inflammatory events induced by CYP (Fig 4). The quinovic acid glycosides from *U. tomentosa* are considered its most potent anti-inflammatory

constituents [8]. Based on this literature data and our experimental results, we conclude that QAPF from *U. tomentosa* is a good candidate for further in vivo studies.

It seems that the analgesic effects observed during QAPF treatment may be mediated by the modulation of inflammatory responses. Therefore, the recruitment of neutrophils into the bladder of the mice was measured by myeloperoxidase activity (MPO). In this work, we demonstrated that the increase in MPO activity following CYP administration was markedly attenuated by both Mesna and QAPF (Fig 5). Furthermore, treatment with QAPF significantly decreased the secretion of the cytokine IL-1 β to basal levels (Fig 6). However, previous in vitro data revealed that the hydroethanolic extract of *U. tomentosa* has the ability to promote IL-1 β secretion, via NF- κ B inhibition [10, 11]. Based on the results obtained in this work, it is feasible to suggest that part of the antinociceptive and anti-inflammatory action induced by QAPF is likely mediated by a decrease in neutrophils recruitment and a decreased release of IL-1 β .

P2X7 receptors are constitutively expressed in the urothelium and submucosal of rat [29, 30] and mouse urinary bladder under normal conditions [21, 31] and are up-regulated in the urinary bladder of patients with symptomatic outlet obstruction [32] and bladders of CYP-induced HE-model mice [21]. Furthermore, P2X7 receptors are involved in neutrophil infiltration and in the maturation and release of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β [33]. Although the individual inhibition of molecules such as IL-1 β has already been demonstrated to decrease bladder damage induced by CYP [34, 35], we decided to investigate the role of QAPF on P2X7R levels due the significant reduction of MPO activity observed in this work. First, we confirmed by immunohistochemical analysis that P2X7R expression is up-regulated approximately three-fold in the bladder submucosal layer in the same model of HE induced by CYP (Fig 7A and 7C), as already demonstrated by our group [21]. Notably, QAPF partially prevented the loss of the urothelium with consequent returning of immunoreactivity to P2X7R in this layer (Fig 7D) as in saline group (Fig 7B). Importantly, we observed a marked down-regulation of P2X7R in the submucosal layer of the bladder (Fig 7A and 7D) after treatment with QAPF. We suggest that this down-regulation is most likely occurring due to the reduced migration of neutrophils, as observed by decreased MPO levels in the inflamed bladders (Fig 5).

Given this set of results we hypothesized that the QAPF, as well as Mesna, could bind to acrolein (CYP toxic metabolite) producing an inactive compound, thereby minimizing toxic effects on the bladder. This hypothesis is plausible because QAPF, by preventing cellular damage (edema and hemorrhage) induced by CYP (Figs 3 and 4), probably decreased the release of several inflammatory mediators, among them nucleotides as ATP, which is a specific P2X7R agonist. As previously demonstrated in the same experimental model, neutrophils and macrophage migration depends of P2X7R activation [21]. As our results clearly indicate, the neutrophils migration to bladder tissue (as seen in diminished MPO activity in Fig 5) as well the release of the cytokine IL-1 β (Fig 6) were reduced. The P2X7R immunoreactivity was also reduced in the bladder submucosal layer (Fig 7), suggesting that QAPF prevents the neutrophils migration to this tissue and consequently prevents the up-regulation of P2X7R in this immunological cells. We could therefore hypothesize that QAPF mediated its effects by modulated the inflammatory responses. Therefore, the involvement of P2X7R in the bladder tissue inflammation induced by CYP cannot be excluded since the pharmacological blockade or the genetic deletion of P2X7R prevented the nociceptive and inflammatory events, as we have previously shown [21].

Although more studies are necessary to prove this hypothesis, the results of the present study demonstrated that QAPF from *U. tomentosa* exhibits a protective effect on HE-induced urothelial damage and reduces visceral pain, with decreased IL-1 β levels and down-regulate P2X7R expression, most likely by inhibit neutrophils migration. Taken together, these results reveal that systemic treatment with QAPF is able to prevent significant nociceptive and

inflammatory events associated with HE and may offer a promising therapeutic approach for the prevention and/or adjuvant therapy for treating this disease.

Supporting Information

S1 Fig. Locomotor parameters, assigned at 30-min intervals during 4 h, after the injection period of different treatments in CYP-induced hemorrhagic cystitis in mice. The locomotor parameters were evaluated in the open-field arena.

(TIF)

S1 Table. Wet bladder weight analysis in the groups: saline, QAPF, CYP, CYP + Mesna and CYP + QAPF.

(XLS)

Acknowledgments

We would like to thank to Mr. Juliano Soares and Mr. Tiago Giuliani Lopes for their excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FD JPM SK RBMS LR GGO FBM MMC AMOB. Performed the experiments: FD JPM SK RBMS LR. Analyzed the data: FD JPM LR MIAE FBM MMC AMOB. Contributed reagents/materials/analysis tools: FD MIAE GGO FBM MMC AMOB. Wrote the paper: FD AMOB.

References

1. Keplinger K, Laus G, Wum M, Dierich MP, Teppner H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol.* 1999; 64: 23–34. PMID: [10075119](#)
2. Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J, Angeles' FM, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine.* 2002; 9: 325–337. PMID: [12120814](#)
3. Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry.* 2005; 66: 5–29. PMID: [15649507](#)
4. Fennell D. Determinants of supplement usage. *Prev Med.* 2004; 39: 932–939. PMID: [15475026](#)
5. Rosenbaum CC, O'Mathúna DP, Chavez M, Shields K. Antioxidants and antiinflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Altern Ther Health Med.* 2010; 16: 32–40. PMID: [20232616](#)
6. Cisneros FJ, Jayo M, Niedziela L. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96: 355–364. PMID: [15619552](#)
7. Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reininger E, et al. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2002; 81: 271–276. PMID: [12065162](#)
8. Aquino R, De Feo V, De Simone F, Pizza C, Cirino G. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J Nat Prod.* 1991; 54: 453–459. PMID: [1919590](#)
9. Sandoval-Chacón M, Thompson JH, Zhang XJ, Liu X, Mannick EE, Sadowska-Krowicka H, et al. Anti-inflammatory actions of cat's claw: the role of NF- κ B. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998; 12: 1279–1289. PMID: [9882039](#)
10. Allen-Hall L, Cano P, Arnason JT, Rojas R, Lock O, Lafrenie RM. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 β and TNF- α . *J Ethnopharmacol.* 2007; 109: 312–317. PMID: [16959454](#)
11. Allen-Hall L, Arnason JT, Cano P, Lafrenie RM. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- α inhibitor through NF- κ B. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127: 685–693. doi: [10.1016/j.jep.2009.12.004](#) PMID: [19995599](#)

12. Manikandan R, Kumar S, Dorairajan LN. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. *Indian J Urol.* 2010; 26: 159–166. doi: [10.4103/0970-1591.65380](https://doi.org/10.4103/0970-1591.65380) PMID: [20877590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20877590/)
13. Santos AA Jr, Leal PC, Edelweiss MI, Lopes TG, Calixto JB, Morrone FB, et al. Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010; 382: 399–407. doi: [10.1007/s00210-010-0555-0](https://doi.org/10.1007/s00210-010-0555-0) PMID: [20809237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20809237/)
14. Bhatia K, Ahmad F, Rashid H, Raisuddin S. Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 3368–3374. doi: [10.1016/j.fct.2008.08.011](https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.011) PMID: [18786597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18786597/)
15. Batista CK, Brito GA, Souza ML, Leitão BT, Cunha FQ, Ribeiro RA. A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39: 1475–1481. PMID: [17146560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17146560/)
16. Morais MM, Belarmino-Filho JN, Brito GA, Ribeiro RA. Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis—comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32: 1211–1215. PMID: [10510257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10510257/)
17. Traxer O, Desgrandchamps F, Sebe P, Haab F, Le Duc A, Gattegno B, et al. Hemorrhagic cystitis: etiology and treatment. *Prog Urol.* 2001; 11: 591–601. PMID: [11761677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11761677/)
18. Phelps PT, Anthes JC, Correll CC. Characterization of adenosine receptors in the human bladder carcinoma T24 cell line. *Eur J Pharmacol.* 2006; 536: 28–37. PMID: [16581066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16581066/)
19. Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem.* 2004; 4: 793–803. PMID: [15078211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15078211/)
20. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413–492. PMID: [9755289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9755289/)
21. Martins JP, Silva RB, Coutinho-Silva R, Takiya CM, Battastini AM, Morrone FB, et al. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. *Br J Pharmacol.* 2012; 165: 183–196. doi: [10.1111/j.1476-5381.2011.01535.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01535.x) PMID: [21675966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21675966/)
22. Pavei C, Kaiser S, Verza SG, Borre GL, Ortega GG. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 62: 250–257. doi: [10.1016/j.jpba.2011.12.031](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.031) PMID: [22296654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22296654/)
23. Dietrich F, Kaiser S, Rockenbach L, Figueiró F, Bergamin LS, da Cunha FM, et al. Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line. *Food Chem Toxicol.* 2014; 67: 222–229. doi: [10.1016/j.fct.2014.02.037](https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.037) PMID: [24607820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24607820/)
24. Sheng Y, Bryngelsson C, Pero RW. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *J Ethnopharmacol.* 2000; 69: 115–126. PMID: [10687868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10687868/)
25. Malykhina AP, Lei Q, Erickson CS, Epstein ML, Saban MR, Davis CA, et al. VEGF induces sensory and motor peripheral plasticity, alters bladder function, and promotes visceral sensitivity. *BMC Physiol.* 2012 Dec 19. doi: [10.1186/1472-6793-12-15](https://doi.org/10.1186/1472-6793-12-15)
26. Gray KJ, Engelmann UH, Johnson EH, Fishman IJ. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (Cytosan) therapy. *J Urol.* 1986; 136: 497–500. PMID: [3090278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3090278/)
27. Passos GF, Fernandes ES, Campos MM, Araújo JG, Pesquero JL, Souza GE, et al. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J Immunol.* 2004; 172: 1839–1847. PMID: [14734768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14734768/)
28. Wantuch C, Piesla M, Leventhal L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. *Neurosci Lett.* 2007; 421: 250–252. PMID: [17574748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17574748/)
29. Lee HY, Bardini M, Burnstock G. Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol.* 2000; 163: 2002–2007. PMID: [10799247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10799247/)
30. Negoro H, Urban-Maldonado M, Liou LS, Spray DC, Thi MM, Suadicani SO. Pannexin 1 channels play essential roles in urothelial mechanotransduction and intercellular signaling. *PLoS One.* 2014 Aug 29; 9: e106269. doi: [10.1371/journal.pone.0106269](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106269) PMID: [25170954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25170954/)
31. Vial C, Evans RJ. P2X receptor expression in mouse urinary bladder and the requirement of P2X(1) receptors for functional P2X receptor responses in the mouse urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2000; 131: 1489–1495. PMID: [11090125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11090125/)
32. O'Reilly BA, Kosaka AH, Chang TK, Ford AP, Popert R, McMahon SB. A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU Int.* 2001; 87: 617–622. PMID: [11350400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11350400/)
33. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28: 465–472. PMID: [17692395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17692395/)

34. Kiuchi H, Takao T, Yamamoto K, Nakayama J, Miyagawa Y, Tsujimura A, et al. Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappaB phosphorylation. *J Urol*. 2009; 181: 2339–2348. doi: [10.1016/j.juro.2009.01.015](https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.01.015) PMID: [19303104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19303104/)
35. Dantas AC, Batista-Júnior FF, Macedo LF, Mendes MN, Azevedo IM, Medeiros AC. Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2010; 25: 43–46. PMID: [20126887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20126887/)

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*, 58(3):281-341.

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, 32(1):19-29. doi: 10.1016/j.tins.2008.10.001.

Agarwal PK, Black PC, Kamat AM (2008). Considerations on the use of diagnostic markers in management of patients with bladder cancer. *World J Urol*, 26(1):39-44.

Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reiningger E, Klaas CA, Merfort I (2002). Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol*, 81(2):271-276.

Akesson C, Lindgren H, Pero RW, Leanderson T, Ivars F (2003). An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF-kappa B activity without inducing cell death. *Int Immunopharmacol*, 3(13-14):1889-1900.

Alesawi AM, El-Hakim A, Zorn KC, Saad F (2014). Radiation-induced hemorrhagic cystitis. *Curr Opin Support Palliat Care*, 8(3):235-240. doi: 10.1097/SPC.0000000000000073.

Allen-Hall L, Arnason JT, Cano P, Lafrenie RM (2010). *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF-alpha inhibitor through NF-kappaB. *J Ethnopharmacol*, 127(3):685-693. doi: 10.1016/j.jep.2009.12.004.

Allen-Hall L, Cano P, Arnason JT, Rojas R, Lock O, Lafrenie RM (2007). Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1beta and TNF-alpha. *J Ethnopharmacol*, 109(2):312-317.

Alves LA, de Melo Reis RA, de Souza CA, de Freitas MS, Teixeira PC, Neto Moreira Ferreira D, Xavier RF (2014). The P2X7 receptor: shifting from a low- to a high-conductance channel - an enigmatic phenomenon? *Biochim Biophys Acta*, 1838(10):2578-2587. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.05.015.

Amaral S, Mira L, Nogueira JM, da Silva AP, Helena Florêncio M (2009). Plant extracts with anti-inflammatory properties--a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem*, 17(5):1876-1883. doi: 10.1016/j.bmc.2009.01.045.

Aquino R, De Feo V, De Simone F, Pizza C, Cirino G (1991). Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J Nat Prod*, 54(2):453-459.

Aquino R, De Simone F, Pizza C, Conti C, Stein ML (1989). Plant metabolites. Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *J Nat Prod*, 52(4):679-685.

Bacher N, Tiefenthaler M, Sturm S, Stuppner H, Ausserlechner MJ, Kofler R, Konwalinka G (2006). Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol*, 132(5):615-622.

Banfi C, Ferrario S, De Vincenti O, Ceruti S, Fumagalli M, Mazzola A, D' Ambrosi N, Volontè C, Fratto P, Vitali E, Burnstock G, Beltrami E, Parolari A, Polvani G, Biglioli P, Tremoli E, Abbracchio MP (2005). P2 receptors in human heart: upregulation of P2X6 in patients undergoing heart transplantation, interaction with TNF α and potential role in myocardial cell death. *J Mol Cell Cardiol*, 39(6):929-939.

Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2005). Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem*, 280(11):10759-10765.

Batista CK, Brito GA, Souza ML, Leitão BT, Cunha FQ, Ribeiro RA (2006). A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. *Braz J Med Biol Res*, 39(11):1475-1481.

Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AM (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem*, 319(1-2):61-68. doi: 10.1007/s11010-008-9877-3.

Begg AC, Stewart FA, Vens C (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer*, 11(4):239-253. doi: 10.1038/nrc3007.

Bhatia K, Ahmad F, Rashid H, Raisuddin S (2008). Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. *Food Chem Toxicol*, 46(11):3368-3374. doi: 10.1016/j.fct.2008.08.011.

Bhatia K, Kaur M, Atif F, Ali M, Rehman H, Rahman S, Raisuddin S (2006). Aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* L. ameliorates additive urotoxicity of buthionine sulfoximine and cyclophosphamide in mice. *Food Chem Toxicol*, 44(10):1744-1750.

Birder L, Andersson KE (2013). Urothelial signaling. *Physiol Rev*, 93(2):653-680. doi: 10.1152/physrev.00030.2012.

Birder LA, Ruan HZ, Chopra B, Xiang Z, Barrick S, Buffington CA, Roppolo JR, Ford AP, de Groat WC, Burnstock G (2004). Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(5):F1084-1091.

- Boison D (2013). Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol Rev*, 65(3):906-943. doi: 10.1124/pr.112.006361.
- Braganhol E, Tamajusuku AS, Bernardi A, Wink MR, Battastini AM (2007). Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochim Biophys Acta*, 1770(9):1352-1359.
- Bryan RT, Regan HL, Pirrie SJ, Devall AJ, Cheng KK, Zeegers MP, James ND, Knowles MA, Ward DG (2015). Protein shedding in urothelial bladder cancer: prognostic implications of soluble urinary EGFR and EpCAM. *Br J Cancer*, 112(6):1052-1058. doi: 10.1038/bjc.2015.21.
- Burnstock G (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Raven Press, 107-118.
- Burnstock G (2004). Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem*, 4(8):793-803.
- Burnstock G (2006). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1:S172-181.
- Burnstock G (2014). Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signal*, 10(1):103-155. doi: 10.1007/s11302-013-9395-y.
- Burnstock G, Dumsday B, Smythe A (1972). Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol*, 44(3):451-461.
- Burnstock G, Kennedy C (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*, 16(5):433-440.
- Burnstock G, Verkhatsky A (2009). Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf)*, 195(4):415-447. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x.
- Caon T, Kaiser S, Feltrin C, de Carvalho A, Sincero TC, Ortega GG, Simões CM (2014). Antimutagenic and antiherpetic activities of different preparations from *Uncaria tomentosa* (cat's claw). *Food Chem Toxicol*, 66:30-35. doi: 10.1016/j.fct.2014.01.013.
- Cappellari AR (2013). Caracterização do sistema purinérgico e seu envolvimento na progressão de meduloblastomas. Porto Alegre: UFRGS. Tese de Doutorado.
- Cappellari AR, Pillat MM, Souza HD, Dietrich F, Oliveira FH, Figueiró F, Abujamra AL, Roesler R, Lecka J, Sévigny J, Battastini AM, Ulrich H (2015). Ecto-5'-Nucleotidase Overexpression Reduces Tumor Growth in a Xenograph Medulloblastoma Model. *PLoS One*, 10(10):e0140996. doi: 10.1371/journal.pone.0140996.
- Castilhos LG, Rezer JF, Ruchel JB, Thorstenberg ML, Jaques JA, Schlemmer JB, Doleski PH, Rossato MF, da Silva MA, Casalli EA, da Cruz RC, Ferreira J, Athayde ML, Gonçalves JF, Leal DB (2015). Effect of *Uncaria tomentosa* extract on

purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvant arthritis model. *BMC Complement Altern Med*, 15:189. doi: 10.1186/s12906-015-0694-4.

Chen RC (2015). Organ preservation—will data translate into reality for bladder cancer patients? *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 27(3):133-135. doi: 10.1016/j.clon.2014.11.002.

Chen RC, Shipley WU, Efstathiou JA, Zietman AL (2013). Trimodality bladder preservation therapy for muscle-invasive bladder cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 11(8):952-960.

Cheng AC, Jian CB, Huang YT, Lai CS, Hsu PC, Pan MH (2007). Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. *Food Chem Toxicol*, 45(11):2206-2218.

Chopra B, Gever J, Barrick SR, Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Ford AP, Birder LA (2008). Expression and function of rat urothelial P2Y receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(4):F821-829. doi: 10.1152/ajprenal.00321.2006.

Cisneros FJ, Jayo M, Niedziela L (2005). An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. *J Ethnopharmacol*, 96(3):355-364.

Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic signal*, 2(2):351-360. doi: 10.1007/s11302-005-5302-5.

Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997). Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36(9):1277-1283.

Compan V, Ulmann L, Stelmashenko O, Chemin J, Chaumont S, Rassendren F (2012). P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci*, 32(12):4284-4296. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012.

Cordes I, Kluth M, Zygis D, Rink M, Chun F, Eichelberg C, Dahlem R, Fisch M, Höppner W, Wagner W, Doh O, Terracciano L, Simon R, Wilczak W, Sauter G, Minner S (2013). PTEN deletions are related to disease progression and unfavourable prognosis in early bladder cancer. *Histopathology*, 63(5):670-677. doi: 10.1111/his.12209.

Cotran RS, Kumar V, Collins T (2000). *Robbins: Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6.ed.

Cox PJ (1979). Cyclophosphamide cystitis--identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol*, 28(13):2045-2049.

Dantas AC, Batista-Júnior FF, Macedo LF, Mendes MN, Azevedo IM, Medeiros AC (2010). Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Acta Cir Bras*, 25(1):43-46.

De Martino L, Martinot JL, Franceschelli S, Leone A, Pizza C, De Feo V (2006). Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. *J Ethnopharmacol*, 107(1):91-94.

de Oliveira LZ, Farias IL, Rigo ML, Glanzner WG, Gonçalves PB, Cadoná FC, Cruz IB, Farias JG, Duarte MM, Franco L, Bertol G, Colpo E, Brites PC, Rocha JB, Leal DB (2014). Effect of *Uncaria tomentosa* Extract on Apoptosis Triggered by Oxaliplatin Exposure on HT29 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014:274786. doi: 10.1155/2014/274786.

Dietrich F, Kaiser S, Rockenbach L, Figueiró F, Bergamin LS, da Cunha FM, Morrone FB, Ortega GG, Battastini AM (2014). Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line. *Food Chem Toxicol*, 67:222-229. doi: 10.1016/j.fct.2014.02.037.

Di Virgilio F (2007). Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci*, 28(9):465-472.

Dobrek Ł, Thor PJ (2012). Bladder urotoxicity pathophysiology induced by the oxazaphosphorine alkylating agents and itschemoprevention. *Postepy Hig Med Dosw*, 66:592-602.

Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Avila TV, Soley Bda S, Rivero AJ, Aguilar JL, Acco A (2010). Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. *J Ethnopharmacol*, 130(1):127-133. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.029.

Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Fabossi IA, Lívero FA, Stolf AM, Alves de Souza CE, Gomes Lde O, Constantin RP, Furman AE, Strapasson RL, Teixeira S, Zampronio AR, Muscará MN, Stefanello ME, Acco A (2013). *Uncaria tomentosa* exerts extensive anti-neoplastic effects against the Walker-256 tumour by modulating oxidative stress and not by alkaloid activity. *PLoS One*, 8(2):e54618. doi: 10.1371/journal.pone.0054618.

Droller MJ, Saral R, Santos G (1982). Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Urology*, 20(3):256-258.

Dudek AM, Grotenhuis AJ, Vermeulen SH, Kiemeny LA, Verhaegh GW (2013). Urinary bladder cancer susceptibility markers. What do we know about functional mechanisms? *Int J Mol Sci*, 14(6):12346-12366. doi: 10.3390/ijms140612346.

Farias IL, Araújo MC, Farias JG, Rossato LV, Elsenbach LI, Dalmora SL, Flores NM, Durigon M, Cruz IB, Morsch VM, Schetinger MR (2012). *Uncaria tomentosa* for Reducing Side Effects Caused by Chemotherapy in CRC Patients: Clinical Trial. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012:892182. doi: 10.1155/2012/892182.

Feoktistov I, Biaggioni I (1997). Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev*, 49(4):381-402.

Formenti SC, Demaria S (2009). Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol*, 10(7):718-726. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70082-8.

Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Lluís C (1997). Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol*, 52(4):283-294.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 53(4):527-552.

Freundlieb M, Zimmermann H, Müller CE (2014). A new, sensitive ecto-5'-nucleotidase assay for compound screening. *Anal Biochem*, 446:53-58. doi: 10.1016/j.ab.2013.10.012.

Fristrup N, Ulhøi BP, Birkenkamp-Demtröder K, Mansilla F, Sanchez-Carbayo M, Segersten U, Malmström PU, Hartmann A, Palou J, Alvarez-Múgica M, Zieger K, Borre M, Ørntoft TF, Dyrskjød L (2012). Cathepsin E, maspin, Plk1, and survivin are promising prognostic protein markers for progression in non-muscle invasive bladder cancer. *Am J Pathol*, 180(5):1824-1834. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.023.

Fukuda K, Sakakura C, Miyagawa K, Kuriu Y, Kin S, Nakase Y, Hagiwara A, Mitsufuji S, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H (2004). Differential gene expression profiles of radioresistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer*, 91(8):1543-1550.

Gai L, Cai N, Wang L, Xu X, Kong X (2013). Ursolic acid induces apoptosis via Akt/NF- κ B signaling suppression in T24 human bladder cancer cells. *Mol Med Rep*, 7(5):1673-1677. doi: 10.3892/mmr.2013.1364.

García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Torà M, Fernández F, Real FX, Rothman N (2005). NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*, 366(9486):649-59.

García Giménez D, García Prado E, Sáenz Rodríguez T, Fernández Arche A, De la Puerta R (2010). Cytotoxic effect of the pentacyclic oxindole alkaloid mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark on human Ewing's sarcoma and breast cancer cell lines. *Planta Med*, 76(2):133-136. doi: 10.1055/s-0029-1186048.

García Prado E, García Gimenez MD, De la Puerta Vázquez R, Espartero Sánchez JL, Sáenz Rodríguez MT (2007). Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine*, 14(4):280-284.

Gehring MP, Pereira TC, Zanin RF, Borges MC, Braga Filho A, Battastini AM, Bogo MR, Lenz G, Campos MM, Morrone FB (2012). P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic Signal*, 8(4):729-739. doi: 10.1007/s11302-012-9319-2.

Gehring MP, Kipper F, Nicoletti NF, Sperotto ND, Zanin R, Tamajusuku AS, Flores DG, Meurer L, Roesler R, Filho AB, Lenz G, Campos MM, Morrone FB (2015). P2X7 receptor as predictor gene for glioma radiosensitivity and median survival. *Int J Biochem Cell Biol*, 68:92-100. doi: 10.1016/j.biocel.2015.09.001.

Gessi S, Merighi S, Sacchetto V, Simioni C, Borea PA (2011). Adenosine receptors and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1808(5):1400-1412. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.09.020.

GLOBOCAN (2012). Estimated cancer incidence, mortality and Prevalence worldwide in 2012: International Agency for Research on Cancer website. <http://globocan.iarc.fr>. Updated 2016.

Goding JW, Grobden B, Slegers H (2003). Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta*, 1638(1):1-19.

Griffiths TR, Action on Bladder Cancer (2013). Current perspectives in bladder cancer management. *Int J Clin Pract*, 67(5):435-448. doi: 10.1111/ijcp.12075.

Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, deVere White RW, Sarosdy MF, Wood DP Jr, Raghavan D, Crawford ED (2003). Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med*, 349(9):859-866.

Gudkov SV, Shtarkman IN, Smirnova VS, Chernikov AV, Bruskov VI (2006). Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. *Radiat Res*, 165(5):538-545.

Haldar S, Dru C, Bhowmick NA (2014). Mechanisms of hemorrhagic cystitis. *Am J Clin Exp Urol*, 2(3):199-208.

Hamada N, Maeda M, Otsuka K, Tomita M (2011). Signaling pathways underpinning the manifestations of ionizing radiation-induced bystander effects. *Curr Mol Pharmacol*, 4(2):79-95.

Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y (2007). Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J Radiat Res*, 48(2):87-95.

Hardin SR (2007). Cat's claw: an Amazonian vine decreases inflammation in osteoarthritis. *Complement Ther Clin Pract*, 13(1):25-28.

Haskó G, Cronstein BN (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*, 25(1):33-39.

Haskó G, Sitkovsky MV, Szabó C (2004). Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci*, 25(3):152-157.

Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66(1):5-29.

Hermens AF, Barendsen GW (1969). Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after x-irradiation. *Eur J Cancer*, 5(2):173-189.

Hinata N, Shirakawa T, Zhang Z, Matsumoto A, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S, Gotoh A (2003). Radiation induces p53-dependent cell apoptosis in bladder cancer cells with wild-type- p53 but not in p53-mutated bladder cancer cells. *Urol Res*, 31(6):387-396.

Hou B, Xu ZW, Yang CW, Gao Y, Zhao SF, Zhang CG (2007). Protective effects of inosine on mice subjected to lethal total-body ionizing irradiation. *J Radiat Res*, 48(1):57-62.

Hsu CC, Chuang YC, Chancellor MB (2013). Intravesical drug delivery for dysfunctional bladder. *Int J Urol*, 20(6):552-562. doi: 10.1111/iju.12085.

Hu VY, Malley S, Dattilio A, Folsom JB, Zvara P, Vizzard MA (2003). COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284(2):R574-585.

Huan SK, Lee HH, Liu DZ, Wu CC, Wang CC (2006). Cantharidin-induced cytotoxicity and cyclooxygenase 2 expression in human bladder carcinoma cell line. *Toxicology*, 223(1-2):136-43.

Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, O'Sullivan B, He Z, Peng Y, Tan AC, Zhou L, Shen J, Han G, Wang XJ, Thorburn J, Thorburn A, Jimeno A, Raben D, Bedford JS, Li CY (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med*, 17(7):860-866. doi: 10.1038/nm.2385.

INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga>> Acesso em: 15 abril 2016.

Jacobs BL, Lee CT, Montie JE (2010). Bladder cancer in 2010: how far have we come? *CA Cancer J Clin*, 60(4):244-272. doi: 10.3322/caac.20077.

James ND, Hussain SA, Hall E, Jenkins P, Tremlett J, Rawlings C, Crundwell M, Sizer B, Sreenivasan T, Hendron C, Lewis R, Waters R, Huddart RA; BC2001 Investigators (2012). Radiotherapy with or without chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *N Engl J Med*, 366(16):1477-1488. doi: 10.1056/NEJMoa1106106.

Janicki JJ, Chancellor MB, Kaufman J, Gruber MA, Chancellor DD (2016). Potential Effect of Liposomes and Liposome-Encapsulated Botulinum Toxin and Tacrolimus in the Treatment of Bladder Dysfunction. *Toxins (Basel)*, 8(3). pii: E81. doi: 10.3390/toxins8030081.

Jarvis MF, Khakh BS (2009). ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, 56(1):208-215. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.067.

Kaiser S, Dietrich F, de Resende PE, Verza SG, Moraes RC, Morrone FB, Batastini AM, Ortega GG (2013). Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by cell incubation and cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. *Planta Med*, 79(15):1413-1420. doi: 10.1055/s-0033-1350742.

Karmakar M, Katsnelson MA, Dubyak GR, Pearlman E (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat Commun*, 7:10555. doi: 10.1038/ncomms10555.

Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H (1999). *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.--ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol*, 64(1):23-34.

Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G (2009). Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297(6):F1477-1501. doi: 10.1152/ajprenal.00327.2009.

Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J (2005). Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66(6 Suppl 1):4-34.

Kiuchi H, Takao T, Yamamoto K, Nakayama J, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N, Okuyama A (2009). Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappaB phosphorylation. *J Urol*, 181(5):2339-2348. doi: 10.1016/j.juro.2009.01.015.

Knowles MA, Hurst CD (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*, 15(1): 25-41. doi: 10.1038/nrc3817.

Kotwal S, Choudhury A, Johnston C, Paul AB, Whelan P, Kiltie AE (2008). Similar treatment outcomes for radical cystectomy and radical radiotherapy in invasive bladder cancer treated at a United Kingdom specialist treatment center. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 70(2):456-463.

Latini S, Pedata F (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem*, 79(3):463-484.

Lee HY, Bardini M, Burnstock G (2000). Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol*, 163(6):2002-2007.

Lemmens R, Vanduffel L, Teuchy H, Culic O (1996). Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: the role of ecto-enzymes. *Biochem J*, 316 (Pt 2):551-557.

Leroi N, Lallemand F, Coucke P, Noel A, Martinive P (2016). Impacts of Ionizing Radiation on the Different Compartments of the Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol*, 7:78. doi: 10.3389/fphar.2016.00078.

Lewis SA, Lewis JR (2006). Kinetics of urothelial ATP release. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(2):F332-340.

Lin Z, Yin P, Reierstad S, O'Halloran M, Coon VJ, Pearson EK, Mutlu GM, Bulun SE (2010). Adenosine A1 receptor, a target and regulator of estrogen receptor alpha action, mediates the proliferative effects of estradiol in breast cancer. *Oncogene*, 29(8):1114-1122. doi: 10.1038/onc.2009.409.

Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S (2013). Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J Mol Med (Berl)*, 91(2):165-172. doi: 10.1007/s00109-012-0991-z.

Manikandan R, Kumar S, Dorairajan LN (2010). Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. *Indian J Urol*, 26(2):159-166. doi: 10.4103/0970-1591.65380.

Martins JP, Silva RB, Coutinho-Silva R, Takiya CM, Battastini AM, Morrone FB, Campos MM (2012). The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. *Br J Pharmacol*, 165(1):183-196. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01535.x.

Mello Pde A, Filippi-Chiela EC, Nascimento J, Beckenkamp A, Santana DB, Kipper F, Casali EA, Nejar Bruno A, Pაცეც JD, Zerbini LF, Wink MR, Lenz G, Buffon A (2014). Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. *Mol Biol Cell*, 25(19):2905-2918. doi: 10.1091/mbc.E14-01-0042.

Montserrat-de la Paz S, Fernandez-Arche A, de la Puerta R, Quilez AM, Muriana FJ, Garcia-Gimenez MD, Bermudez B (2016). Mitrephylline inhibits lipopolysaccharide-mediated activation of primary human neutrophils. *Phytomedicine*, 23(2):141-148. doi: 10.1016/j.phymed.2015.12.015.

Morais MM, Belarmino-Filho JN, Brito GA, Ribeiro RA (1999). Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis-comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. *Braz J Med Biol Res*, 32(10):1211-1215.

Naramatsu M, Yamashita T, Kokubun S (1997). The signalling pathway which causes contraction via P2-purinoceptors in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 122(3):558-562.

Narravula S, Lennon PF, Mueller BU, Colgan SP (2000). Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function. *J Immunol*, 165(9):5262-5268.

Negoro H, Lutz SE, Liou LS, Kanematsu A, Ogawa O, Scemes E, Suadicani SO (2013). Pannexin 1 involvement in bladder dysfunction in a multiple sclerosis model. *Sci Rep*, 3:2152. doi: 10.1038/srep02152.

Negoro H, Urban-Maldonado M, Liou LS, Spray DC, Thi MM, Suadicani SO (2014). Pannexin 1 channels play essential roles in urothelial mechanotransduction and intercellular signaling. *PLoS One*, 9(8):e106269. doi: 10.1371/journal.pone.0106269.

- Netto Jr NR (1999). *Urologia Prática*. São Paulo: Atheneu, 4.ed.
- Ng WL, Huang Q, Liu X, Zimmerman M, Li F, Li CY (2013). Molecular mechanisms involved in tumor repopulation after radiotherapy. *Transl Cancer Res*, 2(5):442-448.
- North RA (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82(4):1013-1067.
- Oh HK, Sin JI, Choi J, Park SH, Lee TS, Choi YS (2012). Overexpression of CD73 in epithelial ovarian carcinoma is associated with better prognosis, lower stage, better differentiation and lower regulatory T cell infiltration. *J Gynecol Oncol*, 23(4):274-281. doi: 10.3802/jgo.2012.23.4.274.
- Ohshima Y, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S (2012). Involvement of connexin43 hemichannel in ATP release after γ -irradiation. *J Radiat Res*, 53(4):551-557. doi: 10.1093/jrr/rrs014.
- Ohshima Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Harada H, Suzuki A, Sato M, Kitani H, Kojima S (2010). γ -Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1800(1):40-46. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.10.008.
- O'Reilly BA, Kosaka AH, Chang TK, Ford AP, Popert R, McMahan SB (2001). A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU Int*, 87(7):617-622.
- Ormond SJ, Barrera NP, Qureshi OS, Henderson RM, Edwardson JM, Murrell-Lagnado RD (2006). An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol*, 69(5):1692-1700.
- Park JC, Citrin DE, Agarwal PK, Apolo AB (2014). Multimodal management of muscle-invasive bladder cancer. *Curr Probl Cancer*, 38(3):80-108. doi: 10.1016/j.crrproblcancer.2014.06.001.
- Payne H, Adamson A, Bahl A, Borwell J, Dodds D, Heath C, Huddart R, McMenemin R, Patel P, Peters JL, Thompson A (2013). Chemical- and radiation-induced haemorrhagic cystitis: current treatments and challenges. *BJU Int*, 112(7):885-897.
- Phelps PT, Anthes JC, Correll CC (2006). Characterization of adenosine receptors in the human bladder carcinoma T24 cell line. *Eur J Pharmacol*, 536(1-2):28-37.
- Pilarski R, Filip B, Wietrzyk J, Kuraś M, Gulewicz K (2010). Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine*, 17(14):1133-1139. doi: 10.1016/j.phymed.2010.04.013.
- Pilarski R, Poczekaj-Kostrzewska M, Ciesiołka D, Szyfter K, Gulewicz K (2007). Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Pharmacol Rep*, 59(5):565-572.

Ploeg M, Aben KK, Kiemeney LA (2009). The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol*, 27(3):289-293. doi: 10.1007/s00345-009-0383-3.

Pode D, Perlberg S, Steiner D (1983). Busulfan-induced hemorrhagic cystitis. *J Urol*, 130(2):347-348.

Pollito PAZ (2004). Dendrologia, anatomia do lenho e status de conservação das espécies lenhosas dos gêneros *Cinchona*, *Croton* e *Uncaria* no estado do Acre, Brasil. São Paulo: Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Tese de Doutorado.

Pollito PAZ, Tomazello M (2006). Anatomia do lenho de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* (Rubiaceae) do estado do Acre, Brasil. *Acta Amazônica*. 36(2):169-176.

Popova NR, Gudkov SV, Bruskov VI (2014). Natural purine compounds as radioprotective agents. *Radiats Biol Radioecol*, 54(1):38-49.

Price ME, McKelvey-Martin VJ, Robson T, Hirst DG, McKeown SR (2000). Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in bladder tumor cells. *Radiat Res*, 153(6):788-794.

Quintera JC, Ugaz OL (2003). Uña de gato – *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Revista de Fitoterapia* 3(1):5-16.

Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50(3):413-492.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (2004). *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5.ed.

Ribeiro RA, Freitas HC, Campos MC, Santos CC, Figueiredo FC, Brito GA, Cunha FQ (2002). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J Urol*, 167(5):2229-2234.

Rinner B, Li ZX, Haas H, Siegl V, Sturm S, Stuppner H, Pfragner R (2009). Antiproliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* in human medullary thyroid carcinoma cells. *Anticancer Res*, 29(11):4519-4528.

Rittiner JE, Korboukh I, Hull-Ryde EA, Jin J, Janzen WP, Frye SV, Zylka MJ (2012). AMP is an adenosine A1 receptor agonist. *J Biol Chem*, 287(8):5301-5309. doi: 10.1074/jbc.M111.291666.

Riva L, Coradini D, Di Fronzo G, De Feo V, De Tommasi N, De Simone F, Pizza C (2001). The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. *Anticancer Res*, 21(4A):2457-2461.

Rizzi R, Re F, Bianchi A, De Feo V, de Simone F, Bianchi L, Stivala LA (1993). Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. *J Ethnopharmacol*, 38(1):63-77.

Rockenbach L, Bavaresco L, Fernandes Farias P, Cappellari AR, Barrios CH, Bueno Morrone F, Oliveira Battastini AM (2013). Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. *Urol Oncol*, 31(7):1204-1211. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.10.009.

Rockenbach L, Braganhol E, Dietrich F, Figueiró F, Pugliese M, Edelweiss MI, Morrone FB, Sévigny J, Battastini AM (2014). NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. *Purinergic Signal*, 10(3):421-430. doi: 10.1007/s11302-014-9405-8.

Rojas-Duran R, González-Aspajo G, Ruiz-Martel C, Bourdy G, Doroteo-Ortega VH, Alban-Castillo J, Robert G, Auberger P, Deharo E (2012). Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. *J Ethnopharmacol*, 143(3):801-804. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.015.

Sandoval-Chacón M, Thompson JH, Zhang XJ, Liu X, Mannick EE, Sadowska-Krowicka H, Charbonnet RM, Clark DA, Miller MJ (1998). Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF-kappaB. *Aliment Pharmacol Ther*, 12(12):1279-1289.

Sandoval M, Charbonnet RM, Okuhama NN, Roberts J, Krenova Z, Trentacosti AM, Miller MJ (2000). Cat's claw inhibits TNFalpha production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. *Free Radic Biol Med*, 29(1):71-78.

Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J, Angeles' FM, Musah RA, Bobrowski P, Miller MJ (2002). Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine*, 9(4):325-337.

Santos AA Jr, Leal PC, Edelweiss MI, Lopes TG, Calixto JB, Morrone FB, Campos MM (2010). Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagiccystitis induced by cyclophosphamide in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 382(5-6):399-407. doi: 10.1007/s00210-010-0555-0.

Santos Araújo Mdo C, Farias IL, Gutierrez J, Dalmora SL, Flores N, Farias J, de Cruz I, Chiesa J, Morsch VM, Chitolina Schetinger MR (2012). *Uncaria tomentosa*-Adjuvant Treatment for Breast Cancer: Clinical Trial. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012:676984. doi: 10.1155/2012/676984.

Schenkman E, Lamm DL (2004). Superficial bladder cancer therapy. *ScientificWorldJournal*, 4 Suppl 1:387-399.

Shabbir M, Ryten M, Thompson C, Mikhailidis D, Burnstock G (2008). Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer. *BJU Int*, 101(1):106-112.

Shabir S, Cross W, Kirkwood LA, Pearson JF, Appleby PA, Walker D, Eardley I, Southgate J (2013). Functional expression of purinergic P2 receptors and transient receptor potential channels by the human urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 305(3):F396-406. doi: 10.1152/ajprenal.00127.2013.

Sheng Y, Akesson C, Holmgren K, Bryngelsson C, Giamapa V, Pero RW (2005). An active ingredient of Cat's Claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. *J Ethnopharmacol*, 96(3):577-584.

Sheng Y, Bryngelsson C, Pero RW (2000). Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *J Ethnopharmacol*, 69(2):115-126.

Sheng Y, Pero RW, Amiri A, Bryngelsson C (1998). Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Res*, 18(5A):3363-3368.

Shrivastava S, Mansure JJ, Almajed W, Cury F, Ferbeyre G, Popovic M, Seuntjens J, Kassouf W (2016). The Role of HMGB1 in Radioresistance of Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther*, 15(3):471-479. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0581.

Smith CP, Vemulakonda VM, Kiss S, Boone TB, Somogyi GT (2005). Enhanced ATP release from rat bladder urothelium during chronic bladder inflammation: effect of botulinum toxin A. *Neurochem Int*, 47(4):291-297.

Sologuren I, Rodríguez-Gallego C, Lara PC (2014). Immune effects of high dose radiation treatment: implications of ionizing radiation on the development of bystander and abscopal effects. *Transl Cancer Res*, 3(1):18-31.

Sperlágh B, Illes P (2014). P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 35(10):537-547. doi: 10.1016/j.tips.2014.08.002.

Spychala J (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther*, 87(2-3):161-173.

Stagg J, Smyth MJ (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 29(39):5346-5358. doi: 10.1038/onc.2010.292.

Stearns V, Schneider B, Henry NL, Hayes DF, Flockhart DA (2006). Breast cancer treatment and ovarian failure: risk factors and emerging genetic determinants. *Nat Rev Cancer*, 6(11):886-893.

Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG (2001). Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*, 19(3):666-675.

Steinberg PN (1995). Cat's Claw: an herb from the Peruvian Amazon. *Sidahora*, 35-36.

Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Azambuja AA, Barrios CH, Morrone FB, Oliveira Battastini AM (2010). Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol*, 28(3):260-267. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.01.035.

Stephens TC, Currie GA, Peacock JH (1978). Repopulation of gamma-irradiated Lewis lung carcinoma by malignant cells and host macrophage progenitors. *Br J Cancer*, 38(5):573-582.

Sun Y, Chai TC (2006). Augmented extracellular ATP signaling in bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(1):C27-34.

Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J, Czapiewski P, Biernat W, Zaczek A (2012). CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 20(2):103-107.

Svennersten K, Hallén-Grufman K, de Verdier PJ, Wiklund NP, Poljakovic M (2015). Localization of P2X receptor subtypes 2, 3 and 7 in human urinary bladder. *BMC Urol*, 15:81. doi: 10.1186/s12894-015-0075-9.

Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*, 110(7):993-1002.

Syrimis A (1998). *Uncaria tomentosa*: a review. *British J Phytotherapy*, 5(1):29-31.

Tempest HV, Dixon AK, Turner WH, Elneil S, Sellers LA, Ferguson DR (2004). P2X and P2X receptor expression in human bladder urothelium and changes in interstitial cystitis. *BJU Int* 93(9):1344-1348.

Timóteo MA, Carneiro I, Silva I, Noronha-Matos JB, Ferreirinha F, Silva-Ramos M, Correia-de-Sá P (2014). ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y6 receptors. *Biochem Pharmacol*, 87(2):371-379. doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.007.

Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem*, 274(10):6653-6659.

Traxer O, Desgrandchamps F, Sebe P, Haab F, Le Duc A, Gattegno B, Thibault P (2001). Hemorrhagic cystitis: etiology and treatment. *Prog Urol*, 11(4):591-601.

Valente LMM (2006). Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: Um panorama sobre seus aspectos mais relevantes. *Revista Fitos*, 2(1):48-58.

Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, Dent P (2007). Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther*, 6(3):789-801.

Vial C, Evans RJ (2000). P2X receptor expression in mouse urinary bladder and the requirement of P2X(1) receptors for functional P2X receptor responses in the mouse urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 131(7):1489-1495.

Wang C, Lees-Miller SP (2013). Detection and repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks: new developments in nonhomologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 86(3):440-449. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.01.011.

Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M, Barrick S, Cockayne DA, Birder LA, Apodaca G (2005). ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest*, 115(9):2412-2422.

Wantuch C, Piesla M, Leventhal L (2007). Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. *Neurosci Lett*, 421(3):250-252.

Wen LT, Knowles AF (2003). Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor. *Br J Pharmacol*, 140(6):1009-1018.

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

Wild PJ, Herr A, Wissmann C, Stoehr R, Rosenthal A, Zaak D, Simon R, Knuechel R, Pilarsky C, Hartmann A (2005). Gene expression profiling of progressive papillary noninvasive carcinomas of the urinary bladder. *Clin Cancer Res*, 11(12):4415-4429.

Winder M, Tobin G, Zupančič D, Romih R (2014). Signalling molecules in the urothelium. *Biomed Res Int*, 2014:297295. doi: 10.1155/2014/297295.

Wirsdörfer F, de Leve S, Cappuccini F, Eldh T, Meyer AV, Gau E, Thompson LF, Chen NY, Karmouty-Quintana H, Fischer U, Kasper M, Klein D, Ritchey JW, Blackburn MR, Westendorf AM, Stuschke M, Jendrossek V (2016). Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase (CD73) enhances radiation-induced lung fibrosis. *Cancer Res*, [Epub ahead of print].

Wong TM, Yeo W, Chan LW, Mok TS (2000). Hemorrhagic pyelitis, ureteritis, and cystitis secondary to cyclophosphamide: case report and review of the literature. *Gynecol Oncol*, 76(2):223-225.

Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sun TT (2009). Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int*, 75(11):1153-65. doi: 10.1038/ki.2009.73.

Wu Y, Enting D, Rudman S, Chowdhury S (2015). Immunotherapy for urothelial cancer: from BCG to checkpoint inhibitors and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther*, 15(5):509-523. doi: 10.1586/14737140.2015.1015419.

Yegutkin GG (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*, 1783(5):673-694. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.

Yegutkin GG (2014). Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 49(6):473-497. doi: 10.3109/10409238.2014.953627.

Yu W, Robson SC, Hill WG (2011). Expression and distribution of ectonucleotidases in mouse urinary bladder. *PLoS One*, 6(4):e18704. doi: 10.1371/journal.pone.0018704.

Zheng QY, Li PP, Jin FS, Yao C, Zhang GH, Zang T, Ai X (2013). Ursolic acid induces ER stress response to activate ASK1-JNK signaling and induce apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Cell Signal*, 25(1):206-213. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.012.

Zimmermann H (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5):299-309.

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*, 8(3):437-502. doi: 10.1007/s11302-012-9309-4.

Zupancic D, Jezernik K, Vidmar G (2008). Effect of melatonin on apoptosis, proliferation and differentiation of urothelial cells after cyclophosphamidetreatment. *J Pineal Res*, 44(3):299-306. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00530.x.

8. ANEXOS

8.1 Cópia do certificado de aprovação do comitê de ética para o desenvolvimento dos experimentos *in vivo*.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 127/11 – CEUA

Porto Alegre, 03 de outubro de 2011.

Senhora Pesquisadora:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 11/00243 intitulado: **“Efeito do tratamento in vivo com frações purificadas bioativas de *Uncaria Tomentosa* (WILLD) DC. sobre a cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.
Profª. Fernanda Bueno Morrone
FFARM
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

8.2 Laudo de certificación botánica e autorización de importación da espécie vegetal

Uncaria tomentosa.

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

José Ricardo Campos de la Cruz. Biólogo Colegiado. C. B. P. # 2796

Certifica:

Que, la muestra vegetal conocida como "uña de gato", proporcionada por LABORATORIOS INDUQUIMICA S. A. con RUC # 20101364152., ha sido estudiada y determinada científicamente como: Uncaria tomentosa (Willdenow ex. Roemer & Schultes.) DC. Y en base al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et. al. 1981 se ubica en las siguientes categorías taxonómicas.

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA
CLASE : MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE : ASTERIDAE
ORDEN : RUBIALES
FAMILIA : RUBIACEAE
GENERO : Uncaria Schreb.
ESPECIE : Uncaria tomentosa (Willd. ex. Roem. & Schult.) DC.

Nombre vulgar: "Uña de gato"

Se expide la presente certificación a solicitud de la empresa para los fines que estime conveniente.

Lima, 08 junio del 2006

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urbanización Santa Luzmila





MINISTERIO DE AGRICULTURA
INSTITUTO NACIONAL DE RECURSOS NATURALES
INRENA

[Handwritten Signature]

Nº 007892 -AG-INRENA

PERMISO PARA FAUNA Y FLORA SILVESTRE

Este permiso debe adjuntarse con los especímenes y/o productos a exportar, importar o re-exportar.

EXPORTACION IMPORTACION RE-EXPORTACION

Válido por 60 días calendarios

Nombre : LABORATORIOS INDUQUIMICA S.A.
Domicilio : Calle Santa Lucila Nº 152-154 Urb. Villa Marina, Chorrillos, Lima - Perú
Documento de Identidad : RUC Nº 20101364152
Producto (s) :

UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa*)

Cantidad: 5 kg de corteza molida de uña de gato.

PRODUCTO CON FINES COMERCIALES*****

Los derechos otorgados sobre los recursos biológicos no otorgan derechos sobre los recursos genéticos contenidos en ellos (Art. 1, inciso f del Decreto Supremo 014-2001-AG).

Lugar de Procedencia : Ucayali.
Destinatario : George Gonzáles Ortega
Dirección : Avenida Ipiranga 2752, 90610.000 Porto Alegre - RS BRASIL

Lima, 03 de 07 del 2006

[Handwritten Signature]
Sello y firma del Controlador INRENA
FECHA: 13/07/06
HORA: 11:35

[Handwritten Signature]
Sello y firma del representante de la Autoridad
CITES - PERÚ
INRENA

Acta n° 340-06
S.A n° 6559971154

El titular del presente permiso conoce las disposiciones legales vigentes en la materia y es responsable de su cumplimiento y sujeto a las sanciones correspondientes en caso del incumplimiento total o parcial.

8.3 Outros artigos científicos publicados como autora e em coautoria durante o período do doutorado:

1. Kaiser S, Carvalho AR, Pittol V, **Dietrich F**, Manica F, Machado MM, de Oliveira LF, Oliveira Battastini AM, Ortega GG (2016). Genotoxicity and cytotoxicity of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* (cat's claw): chemotype relevance. *J Ethnopharmacol*, doi: 10.1016/j.jep.2016.05.026.

2. Kiekow CJ, Figueiró F, **Dietrich F**, Vechia LD, Pires EN, Jandrey EH, Gnoatto SC, Salbego CG, Battastini AM, Gosmann G (2016). Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating NF- κ B nuclear translocation and caspase-3 activation. *Eur J Pharm Sci*, 84:116-122. doi: 10.1016/j.ejps.2016.01.019.

3. Cappellari AR, Pillat MM, Souza HD, **Dietrich F**, Oliveira FH, Figueiró F, Abujamra AL, Roesler R, Lecka J, Sévigny J, Battastini AM, Ulrich H (2015). Ecto-5'-nucleotidase overexpression reduces tumor growth in a xenograph medulloblastoma model. *Plos One*, 10(10):e0140996. doi: 10.1371/journal.pone.0140996.

4. Vianna DR, Ruschel L, **Dietrich F**, Figueiró F, Morrone FB, Canto RFS, Corvello F, Velho A, Crestani A, Teixeira H, von Poser GL, Battastini AMO, Eifler-Lima VL (2015). 4-Methylcoumarins with cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. *Med Chem Commun*, 6:905-911. doi: 10.1039/C5MD00039D.

5. Gerhardt D, Bertola G, **Dietrich F**, Figueiró F, Zanotto-Filho A, Moreira Fonseca JC, Morrone FB, Barrios CH, Battastini AM, Salbego CG (2014). Boldine induces cell cycle arrest and apoptosis in T24 human bladder cancer cell line via regulation of ERK, AKT and GSK-3 β . *Urol Oncol*, 32(1):36.e1-9. doi: 10.1016/j.urolonc.2013.02.012.

6. **Dietrich F**, Kaiser S, Rockenbach L, Figueiró F, Bergamin LS, da Cunha FM, Morrone FB, Ortega GG, Battastini AM (2014). Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human

bladder cancer cell line. *Food Chem Toxicol*, 67:222-229. doi: 10.1016/j.fct.2014.02.037.

7. Rockenbach L, Braganhol E, **Dietrich F**, Figueiró F, Pugliese M, Edelweiss MI, Morrone FB, Sévigny J, Battastini AM (2014). NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. *Purinergic Signal*, 10(3):421-430. doi: 10.1007/s11302-014-9405-8.

8. Kaiser S, **Dietrich F**, de Resende PE, Verza SG, Moraes RC, Morrone FB, Battastini AM, Ortega GG (2013). Cat' s claw oxindole alkaloid isomerization induced by cell incubation and cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. *Planta Med*, 79(15):1413-1420. doi: 10.1055/s-0033-1350742.

9. Cappellari AR, Rockenbach L, **Dietrich F**, Clarimundo V, Glaser T, Braganhol E, Abujamra AL, Roesler R, Ulrich H, Battastini AM (2012). Characterization of ectonucleotidases in human medulloblastoma cell lines: ecto-5'NT/CD73 in metastasis as potential prognostic factor. *Plos One*, 7(10):e47468. doi: 10.1371/journal.pone.0047468.