

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

Álison Coldebella da Silva

**INVESTIGAÇÃO DA MODULAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO SOBRE A
RESPOSTA CELULAR A QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGENS DE
CÂNCER DE BEXIGA**

Porto Alegre

2023

Álison Coldebella da Silva

**INVESTIGAÇÃO DA MODULAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO SOBRE A
RESPOSTA CELULAR A QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGENS DE
CÂNCER DE BEXIGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Coorientador(a): Profa. Dra. Ana Maria O. Battastini

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Coldebella da Silva, Álisson
INVESTIGAÇÃO DA MODULAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO
SOBRE A RESPOSTA CELULAR À QUIMIOTERÁPICOS EM
LINHAGENS DE CÂNCER DE BEXIGA / Álisson Coldebella da
Silva. -- 2023.
104 f.
Orientador: Fabrício Figueiró.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2023.

1. Câncer de bexiga. 2. Sinalização Purinérgica. 3.
Bozepinib. I. Figueiró, Fabrício, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, João e Gessi, pelo amor, apoio, incentivo e pelos puxões de orelha. Obrigado por sempre caminharem ao meu lado, acreditando em mim e me ajudando a realizar os meus sonhos. Vocês são o principal alicerce da minha vida e sempre vou levá-los no meu coração.

Ao Jorge, meu querido gatinho, agradeço por me proporcionar momentos felizes, e sempre estar ao meu lado. Aprendi muitas coisas desde que lhe adotei, a principal delas foi o “amor de pai”.

À minha namorada, Denise, agradeço por tornar meus dias mais leves, me ajudar em todos os momentos, cuidar de mim e pelo amor que nós construímos.

À professora Ana Battastini, agradeço por ter me aceitado como aluno e ter me dado essa oportunidade de realizar o mestrado. Agradeço a paciência e os ensinamentos sobre o sistema purinérgico que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Você é um grande exemplo para mim. Obrigado por tudo!

Ao professor Fabrício Figueiró, agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório e assim ter me concedido a oportunidade de um crescimento pessoal e científico. Muito obrigado pelos ensinamentos diários, paciência e pelo exemplo de profissional que és!

Agradeço também a todos os colegas de laboratório, pelas prazerosas manhãs e tardes de trabalho e tudo o ensinamento científico que recebi de vocês.

Ao CNPq, FAPERGS e principalmente a CAPES, agradeço o apoio financeiro.

Também agradeço a todos os funcionários do departamento de bioquímica, da secretaria, portaria, limpeza, e as técnicas de laboratório.

*It's a long hard fight
But I'll always live for tomorrow
I'll look back at myself and say
I did it for love*

QUEEN – It's a hard life

Sumário

PARTE I	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIACÕES	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
PARTE II	20
3. RESULTADOS	21
3.1. CAPÍTULO I	21
3.2. CAPÍTULO II	50
PARTE III	77
4. DISCUSSÃO	78
5. CONCLUSÕES	87
6. PERSPECTIVAS	88
7. REFERÊNCIAS	89
Anexo A: Figura 1: Medição da Hidrólise de ATP, ADP e AMP.....	97
Anexo B: Figura 2: Alterações na progressão do ciclo celular das linhagens T24 após tratamento quimioterápico.....	99
Anexo C: Figura 3: Morte celular induzida pelo tratamento quimioterápicos em linhagens T24	101
Anexo D: Colaborações.....	103

PARTE I

RESUMO

O câncer de bexiga (CB) é um dos 10 tipos de câncer mais prevalentes em todo o mundo, e a segunda neoplasia urogenital mais comum, atinge principalmente indivíduos do sexo masculino e está relacionado com o tabaco e a idade avançada. O prognóstico dos pacientes com CB é preocupante, visto que os tratamentos atuais não são eficazes, e permitem em muitos casos a reincidência do tumor. A sinalização purinérgica é controlada principalmente pela cascata enzimática envolvendo a família NTPDase/E-NPP e ecto-5'-nucleotidase/CD73, que hidrolisam adenosina trifosfato (ATP) extracelular em adenosina (ADO). Alguns trabalhos revelam alteração na expressão das enzimas NTPDase3 e CD73 durante a progressão do CB em camundongos. A ADO gerada da ação destas enzimas desempenha um importante papel no microambiente tumoral agindo como mediador imunossupressor promovendo a proliferação, angiogênese e resistência tumoral. O Bozepinib (BZP) é um interessante candidato a quimioterápico. Estudos mostram suas promissoras atividades farmacológicas, com destaque para sua potente e seletiva ação antitumoral e antimetastática *in vitro* e *in vivo* em câncer de mama, cólon, glioblastoma e melanoma. Nessa circunstância, um dos objetivos desse trabalho foi avaliar a ação citotóxica do BZP em linhagens de CB, e no sistema purinérgico. Nossos primeiros resultados, mostram que o BZP apresentou atividade citotóxicas em células de CB (RT4 e T24) com baixos valores de IC₅₀ quando comparado a uma linhagem celular de fibroblasto humano (MRC-5). Vimos que o tratamento com o BZP induz morte celular por apoptose, com alteração na progressão do ciclo celular e com apenas três ciclos de tratamento as células T24 foram totalmente eliminadas. Além disso, o BZP foi capaz de modular o sistema purinérgico, aumentando a expressão e a atividade de hidrólise da enzima NPP1. Esses resultados mostram que o BZP apresenta uma interessante atividade contra linhagens de CB, porém mais estudos são necessários a fim de compreender o seu mecanismo de ação e toxicidade *in vivo*. Além disso, também decidimos verificar o envolvimento das enzimas NTPDase3 e CD73 na resistência ao tratamento com os Cisplatina (CIS), Gemcitabina (GEM) e Paclitaxel (PTX), principais quimioterápicos utilizados no CB. Para tanto, a NTPDase3 foi super expressa na linhagem T24, por transfecção com pcDNA3, e a CD73 foi silenciada utilizando o sistema CRISPR/Cas. Os clones de cada transfecção foram caracterizados mostrando o sucesso de ambas transformações genéticas. Os resultados mostram que a super expressão da NTPDase3 tornou a linhagem T24 mais resistente aos tratamentos, enquanto o silenciamento da CD73 deixou a linhagem mais sensível ao tratamento com GEM e PTX, enquanto se tornou mais resistente à CIS. Mais estudos são necessários para aprofundar o papel das enzimas purinérgicas na sensibilidade e/ou resistência aos quimioterápicos no tratamento do CB.

ABSTRACT

Bladder cancer (BC) is one of the 10 most prevalent types of cancer worldwide, and the second most common urogenital neoplasm, affects mainly males and is related to tobacco and advanced age. The prognosis of patients with BC is worrying, since current treatments are not effective, and in many cases allow tumor recurrence. Purinergic signaling is mainly controlled by the enzymatic cascade involving the NTPDase/E-NPP family and ecto-5'-nucleotidase/CD73, which hydrolyze extracellular adenosine triphosphate (ATP) into adenosine (ADO). Some proven works on the expression of NTPDase3 and CD73 enzymes during BC progression in mice. The ADO generated from the action of these enzymes plays an important role in the tumor microenvironment acting as an immunosuppressive mediator promoting anticipation, angiogenesis and tumor resistance. Bozepinib (BZP) is an interesting chemotherapy candidate. Studies show its promising pharmacological activities, highlighting its potent and selective antitumor and antimetastatic action in vitro and in vivo in breast, colon, glioblastoma and melanoma cancer. In this circumstance, one of the objectives of this work was to evaluate the cytotoxic action of BZP in BC cell lines, and in the purinergic system. Our first results show that BZP showed cytotoxic activity in BC cells (RT4 and T24) with low IC₅₀ values when compared to a human fibroblast cell line (MRC-5). We saw that treatment with BZP induces cell death by apoptosis, with changes in cell cycle progression and with only three cycles of treatment the T24 cells were eliminated. Furthermore, BZP was able to modulate the purinergic system, increasing the expression and hydrolysis activity of the NPP1 enzyme. These results show that BZP has an interesting activity against BC cell lines, but more studies are needed in order to understand its mechanism of action and toxicity in vivo. In addition, we also discuss the verification of the involvement of NTPDase3 and CD73 enzymes in resistance to treatment with Cisplatin (CIS), Gemcitabine (GEM) and Paclitaxel (PTX), the main chemotherapeutics used in BC. For this purpose, NTPDase3 was overexpressed in the T24 cell line, by transfection with pcDNA3, and CD73 was silenced using the CRISPR/Cas system. Clones from each transfection were characterized showing the success of both genetic transformations. The results show that NTPDase3 overexpression made the T24 cell line more resistant to treatments, while CD73 silencing made the strain more sensitive to GEM and PTX treatment, while becoming more resistant to CIS. More studies are needed to deepen the role of purinergic enzymes in sensitivity and/or resistance to chemotherapy in the treatment of BC.

LISTA DE ABREVIACÕES

ADO Adenosina

ADP Difosfato de adenosina

ADPR ADP-ribose

AMP Adenosina monofosfato

APCP α,β -metileno adenosina-5-desfosfato

ATP Trifosfato de adenosina

AVO *Acidic vesicular organelles*

BC *Bladder cancer*

BCG *Bacilo Calmette-Guerin*

BZP Bozepinib

CB Câncer de bexiga

CD203a PC-1

CD38 ADP-ribose ciclase

CD39 E-NTPDase1

CD73 Ecto-5'-nucleotidase

CIS Cisplatina

CSCs *Cancer stem cells*

DFdCDP Difluorodesoxicitidina difosfato

DFdCMP Difluorodesoxicitidina monofosfato

DFdCTP Difluorodesoxicitidina trifosfato

DNA Ácido desoxirribonucleico

E-NPPs Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases

E-NTPDase Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases

GEM Gemcitabina

HIF-1 α *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

IC₅₀ *Half maximal inhibitory concentration*

IFN α *Cytokine interferon-alpha*

IS Índice de seletividade

MIBC *Muscle-invasive bladder cancer*

NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NMIBC *Non-muscle-invasive bladder cancers*

NPP1 Nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1

NTPDase3 Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase-3

NTPDase5 Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase-5

PTX Paclitaxel

TURBT *Transurethral resection of the bladder tumor*

1. INTRODUÇÃO

Câncer de Bexiga

Estimativas apontam que mais de 500.000 indivíduos são diagnosticados com câncer de bexiga (CB) todos os anos, desta forma o CB é o nono câncer mais diagnosticado no mundo (BRAY *et al.*, 2018). Apenas em 2020, cerca de 210.000 mortes foram causadas pelo CB (SUNG *et al.*, 2021). Aproximadamente 85% dos indivíduos portadores de CB apresentam hematúria indolor, sendo esse o principal sintoma do CB, outros sintomas como incontinência urinária, noctúria, dor ao urinar, esvaziamento incompleto da bexiga e gotejamento pós-micção também podem ser percebidos. A macrohematúria normalmente é notada em estágios avançados da doença (DOBRUCH *et al.*, 2016; ULAMEC *et al.*, 2021). Com o aparecimento dos primeiros sintomas a ultrassonografia seguida da cistoscopia são os exames padrões para o diagnóstico do CB (ULAMEC *et al.*, 2021). O CB é classificado de acordo com a sua capacidade de invadir o tecido, existem dois tipos principais, o CB invasivo não muscular (NMIBC), responsável por cerca de 75% dos diagnósticos, e o CB invasivo muscular (MIBC) ou metastático, diagnosticado em 25% dos casos (MOCH *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2021). A escolha do tratamento é feita de acordo com a classificação da doença, o NMIBC geralmente é tratado com ressecção transuretral do tumor de bexiga (TURBT) acompanhado de quimioterapia ou imunoterapia com a intenção de diminuir a chance de recorrência e progressão da doença. A terapia intravesical pode ser utilizada para complementar a TURBT, é realizada utilizando quimioterápicos ou o bacilo *Calmette-Guerin* (BCG) para banhar a bexiga, visando atingir as células tumorais não removidas pela cirurgia, com o propósito de prevenir a recidiva do tumor (BABJUK *et al.*, 2019; PEYTON *et al.*, 2019). O *bacilo Calmette-Guerin* (BCG) intravesical é uma terapia adjuvante utilizada frequentemente para NMIBC com alto risco de progressão, porém

alguns indivíduos desenvolveram severas reações adversas, como cistite, prostatite granulomatosa, lesões granulomatosas no testículo, hepatite, tuberculose espinhal entre outros (DOBRUCH; OSZCZUDŁOWSKI, 2021; HAN *et al.*, 2020; MIYAZAKI *et al.*, 2013; RAFFRAY *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2021). Contudo, frear o NMIBC é um desafio, a recorrência se mostra inevitável com taxas de 50% a 90% em cinco anos (HUSSAIN *et al.*, 2009). O indivíduo diagnosticado com MIBC é regularmente submetido a cistectomia radical e desvio urinário, que pode ser acompanhando ou não de terapias adjuvantes, porém a cistectomia radical dificulta muito a qualidade de vida do paciente. Dessa forma, alguns indivíduos optam pelo procedimento conservador da bexiga realizando a TURBT acompanhada de radioterapia e/ou quimioterapia (ROYCE *et al.*, 2019; WERNTZ; ADAMIC; STEINBERG, 2019). Os tratamentos disponíveis para o MIBC não são suficientes, devido a sua chance de recorrência e metástase, a taxa de sobrevivência em cinco anos é de cerca de 40% a 60% (MCCONKEY *et al.*, 2015). O principal agente para o surgimento do CB é o tabagismo, correspondendo por cerca de metade dos diagnósticos, bem como, a intensidade dos danos é proporcional a duração do tabagismo (FREEDMAN *et al.*, 2011; VAN OSCH *et al.*, 2016). O tabagismo não é o único fator de risco para o surgimento do CB, o risco de desenvolver a doença é maior conforme o passar dos anos, cerca de 80% dos diagnosticados são adultos acima dos 65 anos de idade (MUSHTAQ; THURAIRAJA; NAIR, 2019). Além disso, os homens são mais acometidos pela doença, com uma incidência de quatro vezes mais quando comparado com mulheres (FERLAY *et al.*, 2013). Curiosamente, em algumas regiões do mundo a mortalidade causada pelo CB é maior nas mulheres (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). A exposição ocupacional as matérias primas de tintas, diesel, metalúrgicas, fabricas de automóveis, entre outras é um

fator de risco grave e pode explicar a grande diferença na incidência do CB entre homens e mulheres (KOGEVINAS *et al.*, 2003).

Tratamento Quimioterápico

A Cisplatina (CIS) é o quimioterápico de primeira escolha para o tratamento do CB podendo ser administrada sozinha ou em associação com um ou mais quimioterápicos visando a melhor resposta terapêutica. Seu mecanismo de ação consiste na ligação ao centro reativo N7 em resíduos de purina, ou seja, formar ligações cruzadas de ácido desoxirribonucleico (DNA), impedindo a replicação e transcrição do mesmo, causando um bloqueio na divisão celular, resultando na morte celular (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014; TABER *et al.*, 2020). O tratamento quimioterápico com CIS para o MIBC ou metastático auxilia na melhora dos resultados, principalmente em indivíduos com ameaça de recidiva ou progressão (BELLMUNT *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2017). O uso da CIS após a TURBT, apresenta uma melhora de 5% a 8% na sobrevida global dos pacientes (ALFRED WITJES *et al.*, 2017; CANCER; AMERICA, 2016). Por outro lado, cerca de 60% dos indivíduos que necessitam de quimioterapia para tratar o CB são resistentes a CIS ou podem ter alguma comorbidade tais como neuropatia, rim único, idade avançada ou complicações cardiovasculares, que impedem o uso deste quimioterápico (CANCER; AMERICA, 2016; JIANG *et al.*, 2021).

A Gemcitabina (GEM) é um antimetabólico, administrada na forma de pró-fármaco, devendo ser primeiramente fosforilada em difluorodesoxicidina monofosfato (dFdCMP) para posteriormente ser novamente fosforilada pela enzima fosfato quinase em formas de difluorodesoxicidina difosfato (dFdCDP) e difluorodesoxicidina trifosfato (dFdCTP), ambas apresentam atividade antitumoral pela inibição da síntese de DNA. A forma dFdCTP consegue se unir à cadeia principal do DNA, inibindo a síntese e, conseqüentemente induzindo a morte celular. Já a segunda forma dFdCDP, igualmente

exerce um efeito citotóxico indireto, provocado pela inibição da ribonucleotídeo redutase (DYAWANAPELLY; KUMAR; CHOURASIA, 2017; HAWRYŁKIEWICZ; PTASZYŃSKA, 2021). A GEM surge como uma opção para indivíduos não elegíveis ou resistentes ao tratamento com CIS, podendo ser utilizada em combinação com outros quimioterápicos para o tratamento do CB (JIANG *et al.*, 2021). Além disso, o tratamento intravesical com GEM pode reduzir as chances de recorrência em indivíduos com CB (STONE, 2018).

O Paclitaxel (PTX) tem afinidade pelos microtúbulos, que por sua vez são os principais componentes do citoesqueleto celular, visto que atuam no desenvolvimento, manutenção e divisão celular. Dessa forma, o PTX se liga à subunidade de tubulina no microtúbulo, reduzindo a sua concentração e interferindo na dinâmica da polimerização dos microtúbulos o que leva à parada do ciclo celular na fase G2/M durante o ponto de verificação mitótico com consequente morte celular (ALQAHTANI *et al.*, 2019; SAMAAAN *et al.*, 2019; WEAVER, 2014). O PTX combinado com a CIS e/ou GEM vem sendo utilizado para o tratamento do CB (ALFRED WITJES *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2021). Novos estudos mostram que nanocarregadores podem melhorar a atividade antitumoral do PTX no tratamento do CB (HU *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018).

Bozepinib

O Bozepinib (BZP) ClC1=CC=C(C=C1)C2=CC=C(C=C2)N3C=NC4=C3C(=O)N(C4)C5=CC=C(C=C5)S(=O)(=O)N6C=NC=CC6 é um composto em pesquisa para o tratamento do câncer. Sua estrutura química contém um anel de 7 membros benzo-fundido e uma porção purina, estudos mostram que o BZP apresenta atividade antitumoral em linhagens celulares de câncer de cólon, glioblastoma, melanoma e mama (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2021; LÓPEZ-CARA *et al.*, 2011; MARCHAL *et al.*, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2014). Além disso, a eficácia do tratamento com BZP *in vivo* em

modelos de câncer de mama e glioblastoma vem sendo animadora (FRAGA DIAS *et al.*, 2021; MARCHAL *et al.*, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2014). Ainda não está claro o mecanismo de ação do BZP, porém trabalhos mostram a sua capacidade de inibição em relevantes vias do câncer como ERKs, Akt, VEGF, HER2 e JNK (DIAS *et al.*, 2021; MARCHAL *et al.*, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2014).

Interessantemente o BZP é capaz de modular o sistema purinérgico, descrito a seguir, em linhagens de glioblastoma, aumentando a expressão e atividade de hidrólise da enzima E-NTPDase1 (CD39), e inibindo a hidrólise da adenosina monofosfato (AMP), com redução da formação de adenosina (ADO), sem alterar a expressão de ecto-5'-nucleotidase (CD73), indicando uma provável inibição direta desta última enzima (DIAS *et al.*, 2021). Aliás, o BZP é um candidato interessante para avaliação contra linhagens de CB, uma vez que já demonstrou efeito antitumoral animador contra diversas linhagens cancerígenas e por ser derivado de uma purina, também se torna interessante avaliar sua ação no sistema purinérgico, visto que resultados anteriores mostram sua modulação no sistema purinérgico em linhagens de glioblastoma (DIAS *et al.*, 2021).

Sinalização Purinérgica

As purinas extracelulares podem interagir com diferentes receptores purinérgicos, que podem ser classificados em P1 (receptores de ADO) ou P2 (receptores de trifosfato de adenosina (ATP)/difosfato de adenosina (ADP)) (KIM; CHOI, 2022). A produção extracelular de ADO pode ser obtida por meio de uma cascata enzimática envolvendo as famílias das ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase) e ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs), que têm a função de hidrolisar o ATP extracelular em ADP e posteriormente em AMP (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Finalmente, o AMP é hidrolisado a ADO pela enzima CD73

(COLGAN *et al.*, 2006), essa é a principal via de produção de ADO extracelular no sistema purinérgico, mais conhecida como via canônica. A via não canônica de formação de ADO extracelular, é iniciada pela ação da enzima ADP-ribose ciclase (CD38) que transforma a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) em ADP-ribose (ADPR), em seguida, o ADPR é convertido em AMP pela enzima PC-1 (CD203a), posteriormente o AMP é hidrolisado a ADO pela ação da enzima CD73 (FERRETTI *et al.*, 2019). Curiosamente, ambas as vias de produção de ADO extracelular são finalizadas pela hidrólise do AMP pela enzima CD73, o que torna essa a principal enzima do sistema purinérgico. Uma das vias imunossupressoras mais importantes no câncer é a formação de ADO a partir do ATP extracelular, pelos elevados níveis de ectonucleotidases expressas pelas células tumorais, especialmente a CD73 (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013). Além disso, altas concentrações de ATP e da ADO estão presentes no microambiente tumoral, auxiliando o desenvolvimento do tumor e sua diferenciação (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

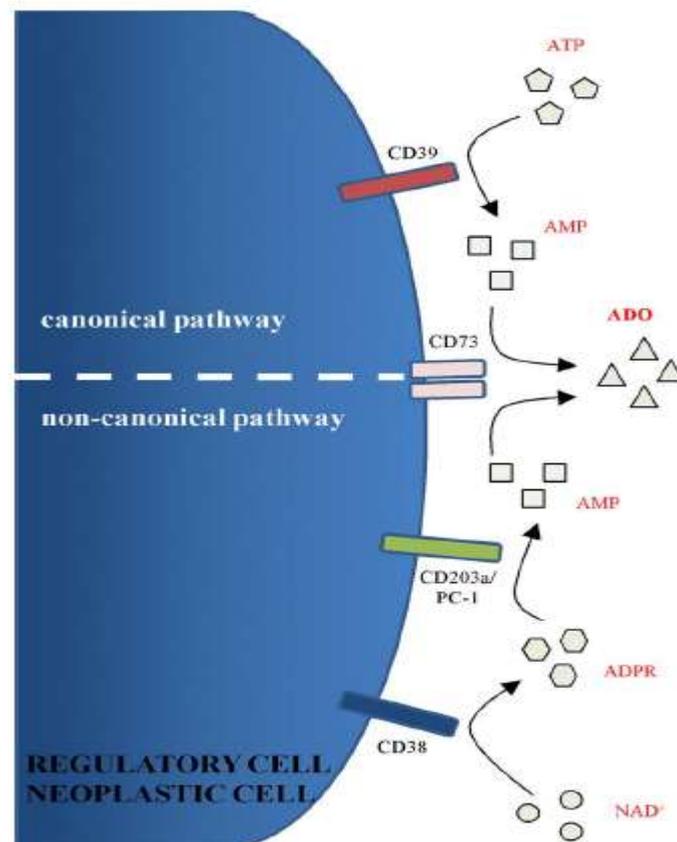


Figura 1: Representação esquemática das vias adenosinérgicas. A expressão e a função de ectoenzimas pertencentes a vias adenosinérgicas canônica e não canônica são mostradas (Adaptado de FERRETTI et al., 2019).

Além disso, visando conter os efeitos imunossupressores/pró-tumorais da ADO no microambiente tumoral, a CD73 tem sido discutida como um importante alvo terapêutico no tratamento do câncer (AZAMBUJA *et al.*, 2019; PERROT *et al.*, 2019).

Sinalização Purinérgica no Câncer de Bexiga

O envolvimento do sistema purinérgico no CB tem sido estudado por nosso grupo de pesquisa. Em um trabalho anterior caracterizamos os perfis de hidrólise de substratos e de distribuição das E-NTPDase e E-NPPs nas células de CB RT4 e T24. Vale ressaltar que a linhagem RT4 é representativa de um CB em estágio inicial (grau 1), já a linhagem T24 representa o CB em estágio avançado (grau 3). O perfil de hidrólise dos substratos nos mostra uma interessante diferença, enquanto a linhagem menos agressiva RT4 tem uma maior capacidade de hidrólise dos substratos ATP e ADP, a linhagem mais agressiva, T24 consegue hidrolisar muito melhor o AMP. A célula RT4 expressa os genes das enzimas Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase-3 (NTPDase3), Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase-5 (NTPDase5) e NPP1, enquanto a linhagem T24 expressa os genes das enzimas NTPDase5 e NPP1; observou-se também que ambas as linhagens expressam o gene da enzima CD73 (STELLA *et al.*, 2010). Além disso, outro interessante trabalho do nosso grupo de pesquisa, mostrou a alteração na expressão das enzimas NTPDase3 e CD73 durante a progressão do CB em modelo de CB em camundongos. O urotélio sadio dos camundongos expressa a enzima NTPDase3, porém a expressão se perde quando esses animais são induzidos ao CB. Em contrapartida, a indução ao CB aumentou a expressão de CD73 no urotélio dos animais, ou seja, conforme o avanço do CB o urotélio perde a expressão da NTPDase3 enquanto a CD73 aumenta a sua expressão (ROCKENBACH *et al.*, 2014). Corroborando com os achados acima, Ferreira *et al.*

avaliaram a expressão de CD39 e CD73 em uma coorte de paciente com CB, a imunorreatividade a CD39 foi encontrada em 72% dos pacientes, enquanto a CD73 foi encontrada em 97% dos casos, porém a expressão elevada de CD39 foi encontrada predominantemente em pacientes com NMIBC (FERREIRA *et al.*, 2021). Os trabalhos citados acima apresentam resultados concretos do envolvimento do sistema purinérgico na tumorigênese do CB.

Os receptores de ADO são expressos em diversos tipos de tecidos tumorais incluindo na bexiga, entre todos, o receptor A2BR é amplamente estudado e correlacionado com a progressão tumoral e proliferação celular. Um estudo mostrou que a inibição do receptor A2BR na linhagem T24 resultou na inibição da proliferação celular por parada na progressão do ciclo celular na fase G1 (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020; ZHOU *et al.*, 2017). Embora haja evidências da relação do sistema purinérgico na tumorigênese do CB, estudos ainda são necessários para uma melhor compreensão dessa relação visando o desenvolvimento de novas terapias para este câncer.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade do BZP em linhagens de CB e investigar a participação das enzimas NTPDase3 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 sobre a resposta celular a quimioterápicos na linhagem T24.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

CAPÍTULO I

1. Avaliar a citotoxicidade do BZP e da CIS em linhagens de CB;
2. Investigar a progressão do ciclo celular, formação de organelas vesiculares ácidas (AVO) e o mecanismo de morte celular (apoptose/necrose) pelo tratamento com BZP e CIS;
3. Explorar o papel do BZP em vias de resistência celular como PD1/PD-L1 e CD133;
4. Investigar a modulação do sistema purinérgico *in vitro* por meio da atividade de hidrólise dos substratos ATP, ADP e AMP e expressão das enzimas purinérgicas após o tratamento com BZP.

CAPÍTULO II

1. Determinar o IC₅₀ dos quimioterápicos CIS, GEM e PTX nas linhagens celulares T24, T24 silenciada para o gene ecto-5'-nucleotidase/CD73 (5'KO) e T24 com super expressão da NTPDase3 (T24 N3).

2. Investigar a progressão do ciclo celular, e o mecanismo de morte celular (apoptose/necrose) após o tratamento com CIS, GEM e PTX nas linhagens celulares T24, 5'KO e T24 N3.

PARTE II

3. RESULTADOS

Os resultados estão descritos em dois capítulos, os quais correspondem a dois artigos de pesquisa originais.

3.1. CAPÍTULO I

**Preclinical evaluation of bozepinib in bladder cancer cell lines: modulation of the
NPP1 enzyme**

Álisson Coldebella da Silva, Juliete Nathali Scholl, Amanda de Fraga Dias, Augusto Ferreira Weber, Fernanda Bueno Morrone, Olga Cruz-López, Ana Conejo-García, Joaquín María Campo, Jean Sévign, Fabrício Figueiró, Ana Maria Oliveira Battastini

Periódico: **Purinergic Signalling**

Status: **Manuscrito submetido à publicação**

3.2. CAPÍTULO II

Assessing the impact of inversion in NTPDase3 and Ecto-5'NT/CD73 expression on drug sensitivity of bladder cancer cells

Liliana Rockenbach, Álisson Coldebella da Silva, Alain Tremblay, Julie Pelletier, Jean Sévigny, Fernanda Bueno Morrone, Fabrício Figueiró, Ana Maria Oliveira Battastini

Periódico: **Purinergic Signalling**

Status: **Manuscrito em preparo para submissão**

PARTE III

4. DISCUSSÃO

O CB é a segunda neoplasia maligna mais comum do trato urinário (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). O prognóstico dos pacientes com CB é pobre, devido à alta chance de recorrência combinada com o risco de progressão. Devido à alta chance de recorrência o CB é uma das neoplasias com o maior custo de tratamento por paciente, já que necessita de constante monitoramento e tratamento (LOTAN *et al.*, 2009; MARTINEZ RODRIGUEZ; BUISAN RUEDA; IBARZ, 2017). Os tratamentos disponíveis para o CB são ineficazes ou auxiliam pouco o indivíduo portador, melhorando a sobrevida global em apenas 5% a 8% (LENIS *et al.*, 2020). Por consequência, é necessário investigar novos tratamentos visando a melhora na sobrevida e evitar os casos de recorrência e progressão do CB.

O Bozepinib (BZP) surge como um potente molécula em pesquisa para o tratamento do câncer, seus resultados promissores mostram uma ação contra glioblastoma, câncer de cólon, mama e melanoma (DIAS *et al.*, 2021; LÓPEZ-CARA *et al.*, 2011; MARCHAL *et al.*, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2014). Alguns estudos descobriram o efeito inibitório do BZP em rotas ligadas à proliferação celular, carcinogênese e angiogênese (DIAS *et al.*, 2021; MARCHAL *et al.*, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2014). Além disso, a eficácia do tratamento com BZP *in vivo* vem chamando a atenção, o co-tratamento com temozolomida + BZP em nanocápsulas reduziu 81% o tamanho do glioma em modelo animal. Além disso, a excelente atividade antimetastática do BZP foi vista em camundongos nude xenotransplantados com câncer de mama (FRAGA DIAS *et al.*, 2021; RAMÍREZ *et al.*, 2014). Considerando os promissores resultados do BZP *in vitro* e *in vivo*, junto com a necessidade do desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do CB, o primeiro capítulo dessa dissertação visa investigar a citotoxicidade do BZP em

linhagens de CB e comparar com a Cisplatina (CIS), o quimioterápico mais utilizado nesse tipo tumoral, bem como avaliar a ação do BZP no sistema purinérgico da linhagem T24.

Observamos que BZP reduziu a viabilidade celular em duas linhagens de CB (T24 e RT4) com baixos valores de IC₅₀ na faixa de micromolar. Isso confirma os resultados anteriores com essa molécula, onde também foi observado baixos valores de IC₅₀ em linhagens celulares de glioblastoma, câncer de cólon e de mama (DIAS *et al.*, 2021; MARCHAL *et al.*, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2014). Avaliamos também o efeito citotóxico do BZP na linhagem celular de fibroblasto humano (MRC-5), observamos um valor de IC₅₀ maior em comparação com os valores obtidos para as células de CB. Com base nesses resultados, calculamos o índice de seletividade *in vitro* (IS), que deve ser considerado na busca de novos fármacos para o tratamento do câncer, pois serve como parâmetro preliminar de segurança e prediz a seletividade de um composto para as células cancerígenas (MULLER; MILTON, 2012). Nossos dados mostram que o BZP apresentou um valor de IS *in vitro* bastante significativo, com valores de 19 e 25 para as linhagens celulares RT4 e T24, respectivamente. Esses resultados mostram que seriam necessárias doses 19 e 25 vezes maiores de BZP para diminuir em 50% a viabilidade de fibroblastos quando comparamos com a dose utilizada para reduzir em 50% a viabilidade celular da linhagem RT4 e T24, respectivamente. Estudos sugerem que compostos com um $IS \geq 10$ são classificados como altamente seletivos para células cancerígenas, enquanto valores ≤ 2 mostram baixa seletividade (AWANG *et al.*, 2014; BADISA *et al.*, 2009; QUISPE M *et al.*, 2006). Em contraste, a CIS apresentou um valor de IC₅₀ mais alto em comparação com o BZP, e um IS *in vitro* próximo a 2, ambos os valores referentes a linhagem celular T24. Trabalhos anteriores também mostraram que a CIS tem um alto valor de IC₅₀ para a linhagem de CB HT1197 (POWLES *et al.*, 2007). Deve-se notar que a linhagem celular

MRC-5 é célula pouco proliferativa de origem não tumoral, o que torna apreciável a baixa toxicidade do BZP em comparação com a CIS.

A redução da viabilidade celular na linhagem T24 foi acompanhada pela parada na progressão do ciclo celular causado pelo tratamento com BZP. Observamos um aumento no número de células na fase G2/M no tratamento com IC₂₅, e nas fases G2/M e S no tratamento com o IC₅₀, devido à parada do ciclo celular. Como reflexo desse aumento, houve uma diminuição na porcentagem de células na fase G0/G1 na linhagem celular T24 com ambos os tratamentos. O presente trabalho é o primeiro relato na literatura mostrando uma parada na progressão do ciclo celular causada exclusivamente pelo tratamento com BZP. Um estudo anterior mostrou que o tratamento combinado com BZP e a citocina interferon-alfa (IFN α) causou um acúmulo de células da fase S em uma linhagem celular de câncer de mama (MARCHAL *et al.*, 2013). A CIS também causou parada na progressão do ciclo celular na linhagem T24. Corroborando com nossos dados, a CIS induziu a parada do ciclo celular na fase G0/G1 em uma linhagem de carcinoma hepatocelular (QU *et al.*, 2013). Como possível consequência da parada na progressão do ciclo celular, nossos resultados mostram que BZP induziu a morte celular por apoptose nas linhagens de CB (T24 e RT4). Estudos no tratamento do câncer estão direcionando o desenvolvimento de novos compostos que dificultam a fuga das células cancerígenas pela indução de apoptose (XU; LAI; HUA, 2019). Por outro lado, a CIS induziu a morte de células T24 por apoptose tardia/necrose. A morte celular por apoptose induzida pelo tratamento com BZP é considerada melhor do que a apoptose tardia ou indução de necrose causada pelo tratamento com CIS. Para concluir nossa comparação, decidimos investigar o efeito do BZP na formação de organelas vesiculares ácidas (AVO), uma indicação de autofagia. No câncer, o papel da autofagia ainda não está claro. Estudos mostram que a autofagia protege as células cancerígenas da apoptose e fornece resistência ao tratamento

quimioterápico (BUCHSER *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017). Por outro lado, quando as células não são nutridas de forma ideal ou são malformadas, como no microambiente tumoral, a autofagia pode causar a morte celular (AMARAVADI; KIMMELMAN; WHITE, 2016; PANDA *et al.*, 2015). Nossos resultados mostram que o BZP causa a formação de AVO, corroborando com achados da literatura (DIAS *et al.*, 2021; MARCHAL *et al.*, 2013). Estudos mostram que o aumento da indução de autofagia em células cancerígenas precede a morte celular por apoptose, portanto nossos resultados apoiam esse achado (GONZÁLEZ-POLO *et al.*, 2005; TRYBUS *et al.*, 2021). Também observamos a formação de AVO induzida pelo tratamento com CIS. A indução da autofagia causada pelo tratamento com CIS já é conhecida (XU; GEWIRTZ, 2022). Assim, a formação de AVO após um ciclo de tratamento pode estar associada à resistência celular ou mesmo a uma via cruzada para indução de apoptose.

Nos últimos anos, surgiu uma nova abordagem para o tratamento do câncer: a inibição do *checkpoint* imunológico PD-1 ou PD-L1. O PD-L1 se liga ao seu receptor, PD-1, que é expresso na superfície de linfócitos relacionados ao sistema imunológico, como células T. Essa ligação é capaz de inibir a citotoxicidade das células T e as células cancerígenas se beneficiam desse mecanismo para se protegerem do sistema imunológico (SHEN; ZHAO, 2018; WU *et al.*, 2019). Observamos que o tratamento com BZP induziu um aumento nas células que expressam PD-L1 após um ciclo de tratamento. Este resultado mostra um possível mecanismo de resistência celular, porém mais dois ciclos de tratamento com BZP puderam matar essas células com perfil de resistência. Os inibidores de PD-L1 já estão sendo usados no tratamento do CB, em combinação com quimioterapia ou radioterapia (DE JONG *et al.*, 2021).

As células-tronco cancerígenas (do inglês, CSCs) são caracterizadas por rápida proliferação e resistência aos tratamentos convencionais. Além disso, estudos indicam

que essas células iniciam a recorrência e metástase do câncer (REN; SHENG; DU, 2013; SOLEIMANI *et al.*, 2022). O tratamento com BZP não extinguiu as células CD133⁺, marcador de CSCs, após um ciclo de tratamento. Assim, decidimos tratar as células T24 com diferentes ciclos de tratamento, prática comum no tratamento quimioterápico, para analisar a resistência celular. Foram necessários três ciclos de tratamento com o IC₅₀ de BZP para que a viabilidade celular caísse abaixo de 1%, onde as células não foram capazes de replicar para um novo ciclo de tratamento, mostrando a eficiência do tratamento em ciclos com BZP. Esse resultado confirma a eficiência do BZP no combate às células cancerígenas, inclusive aquelas que podem adquirir fenótipos de resistência. Em concordância, um estudo anterior mostrou que dois ciclos de tratamento com BZP eram necessários para eliminar células de glioblastoma (DIAS *et al.*, 2021). Por outro lado, o tratamento com o IC₂₅ de BZP não conseguiu eliminar as células CD133⁺, mostrando viabilidade celular constante, indicando resistência como resultado do uso de uma concentração inadequada para induzir a morte celular.

Finalizando os resultados do primeiro capítulo, fomos avaliar se o BZP exerce algum tipo de modulação no sistema purinérgico. Primeiro, examinamos a hidrólise dos substratos de ATP, ADP e AMP e observamos um aumento significativo na hidrólise de ATP e ADP, sem alteração na hidrólise de AMP, na linhagem T24. Dados anteriores do nosso grupo mostram que a linhagem celular T24 expressa as enzimas NTPDase5 e pirofosfatase/fosfodiesterase 1 (NPP1) (STELLA *et al.*, 2010), portanto, analisamos o efeito do BZP na expressão gênica dessas duas enzimas. Observamos que o tratamento com BZP foi capaz de induzir um aumento na expressão gênica da enzima *ENPP1*. Decidimos aprofundar a investigação e medir a expressão proteica dessa enzima após o tratamento com BZP. Complementando o resultado anterior, observamos um aumento significativo na porcentagem de células e na expressão de NPP1 após o tratamento com

BZP. NPP1 é a enzima mais amplamente expressa da família NPP, que consiste em 7 membros, e seu principal substrato é o ATP, que pode ser hidrolisado a ADP ou diretamente a AMP (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Nossos resultados mostram que o tratamento com BZP induziu um aumento na expressão de NPP1 o que pode explicar o aumento em sua atividade de hidrólise de substratos de ATP e ADP. Estudos demonstraram que altos níveis de ATP no microambiente tumoral favorecem a progressão local e a metástase em vários tipos de câncer (TAKAI *et al.*, 2014; XIA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). Além disso, o ATP pode ativar alguns receptores purinérgicos da família P2, que têm como função auxiliar o crescimento de células tumorais e saudáveis (SCHULIEN *et al.*, 2020). Um interessante trabalho mostrou que o ATP extracelular regula o fator indutor de hipóxia 1α (HIF- 1α), e promove a quimiorresistência no câncer de mama (YANG *et al.*, 2022). Esses achados evidenciam o envolvimento pró-tumoral do ATP extracelular. Nossos resultados mostram que o BZP é capaz de diminuir a presença desse agonista por meio do aumento da expressão da enzima NPP1. O tratamento com BZP também causou um aumento significativo na hidrólise de ADP na linhagem RT4. Este aumento na hidrólise de ADP pode ser devido ao efeito de BZP na enzima NPP1 (STELLA *et al.*, 2010), que também pode hidrolisar o ADP (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Para completar a investigação do efeito do BZP no sistema purinérgico da linhagem celular T24, decidimos avaliar seu efeito nas enzimas purinérgicas, CD39 e CD73. Nossos resultados mostram que BZP não altera a expressão da enzima CD39 ou da enzima CD73, sugerindo que NPP1 é o principal responsável pelo aumento da hidrólise de ATP e ADP após o tratamento com BZP. Além disso, os resultados animadores apresentados nesse estudo, encorajam novos trabalhos a fim de melhor compreender o mecanismo de ação do BZP e toxicidade, além de investigar seu possível potencial terapêutico *in vivo* no tratamento do CB.

Os resultados apresentados no segundo capítulo dessa dissertação estão descritos na forma de um manuscrito, que está sendo preparado para submissão na revista *Purinergic Signalling*, no qual compartilho a autoria com a Dra. Liliana Rockenbach. As células T24 super expressando a NTPDase3 (T24 N3) e T24 com silenciamento da ecto-5'-nucleotidase/CD73 (5'KO) foram produzidas pela Dra. Liliana Rockenbach, juntamente com os experimentos que comprovaram o sucesso de ambas transformações genéticas, durante o seu estágio “sanduíche” no Laboratório do Dr. Jean Sèvigny na Universidade de Laval, em Québec, no Canadá. A minha contribuição para esse manuscrito foi investigar a participação das enzimas NTPDase3 e CD73 sobre a resposta celular a quimioterápicos (CIS, GEM e PTX) nas linhagens T24 e suas formas geneticamente modificadas.

Antes de realizar qualquer experimento, precisei garantir que as linhagens (T24 N3 e 5'KO) estavam em condições ideais de acordo com o perfil enzimático proposto (T24 N3 com uma atividade de hidrólise de ATP/ADP maior comparado com a sua linhagem controle T24 EV, e a linhagem 5'KO não hidrolisando o substrato AMP, comparado com a linhagem controle T24). Para tanto, foi necessário medir o perfil de hidrólise dos substratos ATP, ADP e AMP (Resultados disponíveis no Anexo A), utilizando o método verde de malaquita (CHAN; DELFERT; JUNGER, 1986), para medir o fosfato inorgânico, e o método de Coomassie blue para quantificar a concentração proteica (BRADFORD, 1976), conforme descrito nos capítulos I e II.

Primeiramente, determinamos o IC_{50} dos quimioterápicos para as linhagens T24. Observamos que o processo de transfecção e cultivo da célula T24 EV com geneticina não alterou a sensibilidade da mesma, pois o IC_{50} das linhagens T24 e T24 EV se mostrou semelhante aos diferentes tratamentos. A participação da enzima NTPDase3 no CB tem sido pouco investigada, mas estudos do nosso grupo mostraram que a linhagem RT4 (grau

1), expressa o gene da enzima NTPDase3, enquanto a linhagem T24 (grau 3), não expressa o gene desta enzima. Além disso, em um trabalho anterior, também mostramos uma alteração na expressão das enzimas NTPDase3 e da CD73 durante a progressão do CB em camundongos. Sabe-se que a NTPDase3 está envolvida no processo inflamatório. Um estudo mostrou que camundongos deficientes em NTPDase3, apresentaram colite agravada induzida por sulfato de sódio de dextran, quando comparados aos animais controle (FELDBRÜGGE *et al.*, 2017). Nossos resultados mostram que a linhagem T24 com super expressão da NTPDase3 (T24 N3) se mostrou mais resistente ao tratamento com todos os quimioterápicos testados. Como citado anteriormente, a linhagem T24 não expressa o gene da enzima NTPDase3, sendo expressa apenas pela linhagem menos agressiva RT4. Assim, quando a linhagem T24 passa por um processo de super expressão da enzima NTPDase3 e ganha uma característica purinérgica de uma linhagem menos agressiva, o tratamento quimioterápico passou a ser menos eficiente contra essa linhagem celular o que nos leva a cogitar a participação da enzima NTPDase3 no processo de resistência ao tratamento quimioterápico.

A ecto-5'nucleotidase/CD73, a principal enzima de formação de adenosina, tem sido mais estudada em processos inflamatórios e câncer. Em diversos tipos de cânceres a alta expressão de CD73 vem sendo relacionada a desfechos clínicos desfavoráveis (GAUDREAU *et al.*, 2016; LOI *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2012). Além disso, a ADO está relacionada à imunossupressão, auxílio para o desenvolvimento tumoral e metástase (JIN *et al.*, 2010; ROH *et al.*, 2020). Dessa forma, camundongos deficientes em CD73 apresentam maior resistência à carcinogênese e metástase (STAGG *et al.*, 2011, 2012). Aliás, a inibição da CD73 por anticorpo monoclonal ou por α,β -metileno adenosina-5-difosfato (APCP), um inibidor seletivo da CD73, resulta em um menor crescimento tumoral e inibe a proliferação celular (ROCKENBACH *et al.*, 2013;

STAGG *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2007). Loi e colaboradores mostraram que a expressão de CD73 em pacientes com câncer de mama triplo-negativo está correlacionada com a resistência ao tratamento quimioterápico a base de doxorubicina. Essa resistência se dá pelo acúmulo de ADO extracelular e por consequência, a ativação do receptor A2A de ADO que suprime as células T CD8 (LOI *et al.*, 2013). No presente trabalho nós observamos que a linhagem T24 com silenciamento da CD73 (5'KO) apresentou um IC₅₀ menor quando comparado à célula T24, que super expressa a CD73 (controle), para os quimioterápicos GEM e PTX. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com a literatura, onde uma linhagem celular deficiente em CD73 (5'KO) se mostrou mais sensível ao tratamento com GEM e PTX. Em contrapartida, as células 5'KO apresentaram um IC₅₀ maior para CIS, demonstrando que essas células ficaram mais resistentes a este quimioterápico nas condições testadas. Mais estudos são necessários para investigar o papel das enzimas purinérgicas, na sensibilidade e/ou resistência à quimioterapia no CB.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, mostramos que o BZP possui ação citotóxica em linhagens de CB, por reduzir a viabilidade celular com baixos valores de IC_{50} . Além disso, o BZP apresentou valores de IS *in vitro* mais elevados em comparação com o agente quimioterápico de referência, a CIS. Também observamos que o tratamento com BZP induziu parada na progressão do ciclo celular seguida de morte por apoptose. Embora o BZP induzisse resistência celular após um ciclo de tratamento, três ciclos foram suficientes para praticamente eliminar as células resistentes. O tratamento com BZP foi capaz de modular o sistema purinérgico, aumentando a hidrólise do ATP e ADP por ação da enzima NPP1.

Além disso, evidenciamos que a enzima NTPDase3 pode ser considerada um fator de resistência ao tratamento quimioterápico no CB, enquanto o silenciamento da enzima CD73 tornou a linhagem T24 mais sensível ao tratamento com GEM e PTX, porém deixou a linhagem mais resistente ao tratamento com CIS.

6. PERSPECTIVAS

CAPÍTULO I

- Seguir avaliando a ação do BZP no sistema purinérgico da linhagem RT4;
- Investigar a possível indução de autofagia causada pelo tratamento com BZP na linhagem T24;
- Explorar o potencial terapêutico e citotóxico do BZP em modelo *in vivo* de CB.

CAPÍTULO II

- Investigar a função dos receptores de ATP e ADO na resistência aos tratamentos quimioterápicos;

7. REFERÊNCIAS

- ALFRED WITJES, J. *et al.* Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. **European Urology**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 462–475, 2017.
- ALQAHTANI, Fulwah Yahya *et al.* Paclitaxel. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, [s. l.], v. 44, p. 205–238, 2019.
- AMARAVADI, Ravi; KIMMELMAN, Alec C.; WHITE, Eileen. Recent insights into the function of autophagy in cancer. **Genes and Development**, [s. l.], v. 30, n. 17, p. 1913–1930, 2016.
- AWANG, Normah *et al.* Cytotoxicity and mode of cell death induced by triphenyltin (IV) compounds in vitro. **OnLine Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 84–93, 2014.
- AZAMBUJA, J. H. *et al.* CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 3260–3279, 2019.
- BABJUK, Marko *et al.* European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. **European urology**, Switzerland, v. 76, n. 5, p. 639–657, 2019.
- BADISA, Ramesh B. *et al.* Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 2993–2996, 2009.
- BELLMUNT, J. *et al.* Bladder cancer: ESMO practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 25, n. August, p. iii40–iii48, 2014.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BUCHSER, William J. *et al.* Cell-mediated autophagy promotes cancer cell survival. **Cancer Research**, [s. l.], v. 72, n. 12, p. 2970–2979, 2012.
- BURNSTOCK, Geoffrey; DI VIRGILIO, Francesco. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic signalling**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 491–540, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797685>.
- CAMPOS-CONTRERAS, Anaí Del Rocío; DÍAZ-MUÑOZ, Mauricio; VÁZQUEZ-CUEVAS, Francisco G. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. **Cells**, Switzerland, v. 9, n. 7, 2020.

CANCER, Genitourinary; AMERICA, North. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer : A Systemic Review and Two-Step Meta-Analysis. [s. l.], p. 1–8, 2016.

CHAN, Kwok-Ming; DELFERT, Dennis; JUNGER, Kurt D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 157, n. 2, p. 375–380, 1986. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269786906408?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2019.

CHANG, Sam S. *et al.* Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline. **Journal of Urology**, [s. l.], v. 198, n. 3, p. 552–559, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2017.04.086>.

COLGAN, Sean P *et al.* Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic signalling**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 351–360, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404475>.

CRUZ-LÓPEZ, Olga *et al.* 1-(Benzenesulfonyl)-1,5-dihydro-4,1-benzoxazepine as a new scaffold for the design of antitumor compounds. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1129–1140, 2017.

DASARI, Shaloam; BERNARD TCHOUNWOU, Paul. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 740, p. 364–378, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.

DE JONG, Florus C. *et al.* Improving anti-pd-1/pd-11 therapy for localized bladder cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1–15, 2021.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 293–303, 2017.

DIAS, Amanda de Fraga *et al.* New insights into cytotoxic mechanisms of bozopinib against glioblastoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 162, n. February, 2021.

DOBRUCH, Jakub *et al.* Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. **European Urology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 300–310, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.037>.

DOBRUCH, Jakub; OSZCZUDŁOWSKI, Maciej. Bladder cancer: Current challenges and future directions. **Medicina (Lithuania)**, [s. l.], v. 57, n. 8, 2021.

DYAWANAPELLY, Sathish; KUMAR, Animesh; CHOURASIA, Manish K. Lessons learned from gemcitabine: Impact of therapeutic carrier systems and gemcitabine's drug conjugates on cancer therapy. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 63–69, 2017.

FELDBRÜGGE, Linda *et al.* Expression of Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases-2 and -3 in the Enteric Nervous System Affects Inflammation in Experimental Colitis and Crohn's Disease. **Journal of Crohn's & colitis**, England, v. 11, n. 9, p. 1113–1123, 2017.

- FERLAY, J *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 1374–1403, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>.
- FERREIRA, Janaina Mendes *et al.* High CD39 expression is associated with the non-muscle-invasive phenotype of human bladder cancer. **Oncotarget**, United States, v. 12, n. 16, p. 1580–1586, 2021.
- FERRETTI, E. *et al.* Canonical and non-canonical adenosinergic pathways. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 205, n. March, p. 25–30, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.03.007>.
- FRAGA DIAS, Amanda de *et al.* Development of bozopinib-loaded nanocapsules for nose-to-brain delivery: preclinical evaluation in glioblastoma. **Nanomedicine (London, England)**, England, v. 16, n. 23, p. 2095–2115, 2021.
- FREEDMAN, Neal D *et al.* Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. **JAMA**, [s. l.], v. 306, n. 7, p. 737–745, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846855>.
- GAUDREAU, Pierre-Olivier *et al.* CD73-adenosine reduces immune responses and survival in ovarian cancer patients. **Oncoimmunology**, United States, v. 5, n. 5, p. e1127496, 2016.
- GONZÁLEZ-POLO, Rosa Ana *et al.* The apoptosis/autophagy paradox: Autophagic vacuolization before apoptotic death. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 118, n. 14, p. 3091–3102, 2005.
- HAN, Jiansong *et al.* Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 129, n. April, p. 110393, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110393>.
- HAWRYŁKIEWICZ, Aleksandra; PTASZYŃSKA, Natalia. Gemcitabine Peptide-Based Conjugates and Their Application in Targeted Tumor Therapy. **Molecules (Basel, Switzerland)**, Switzerland, v. 26, n. 2, 2021.
- HU, Bo *et al.* Lumbrokinase/paclitaxel nanoparticle complex: Potential therapeutic applications in bladder cancer. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 13, p. 3625–3640, 2018.
- HUSSAIN, Maha H.A. *et al.* Bladder cancer: Narrowing the gap between evidence and practice. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 34, p. 5680–5684, 2009.
- JIANG, Di Maria *et al.* Defining cisplatin eligibility in patients with muscle-invasive bladder cancer. **Nature Reviews Urology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 104–114, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41585-020-00404-6>.
- JIN, Dachuan *et al.* CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. **Cancer research**, United States, v. 70, n. 6, p. 2245–2255, 2010.
- KIM, Sung Huhn; CHOI, Jae Young. Purinergic signaling in the peripheral vestibular system. **Purinergic signalling**, Netherlands, v. 18, n. 2, p. 165–176, 2022.

- KOGEVINAS, Manolis *et al.* Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. **Cancer Causes and Control**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 907–914, 2003.
- LENIS, Andrew T *et al.* Bladder Cancer: A Review. **JAMA**, United States, v. 324, n. 19, p. 1980–1991, 2020.
- LI, Ying Jie *et al.* Autophagy and multidrug resistance in cancer. **Chinese journal of cancer**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 52, 2017.
- LIU, Yongjia *et al.* **Paclitaxel/Chitosan Nanosuspensions Provide Enhanced Intravesical Bladder Cancer Therapy with Sustained and Prolonged Delivery of Paclitaxel**. [S. l.: s. n.], 2018-. ISSN 25766422.v. 1
- LOI, Sherene *et al.* CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 110, n. 27, p. 11091–11096, 2013.
- LÓPEZ-CARA, Luisa C. *et al.* New (RS)-benzoxazepin-purines with antitumour activity: The chiral switch from (RS)-2,6-dichloro-9-[1-(p-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9H-purine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 249–258, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.011>.
- LOTAN, Yair *et al.* Key concerns about the current state of bladder cancer: A position paper from the Bladder Cancer Think Tank, the Bladder Cancer Advocacy Network, and the Society of Urologic Oncology. **Cancer**, [s. l.], v. 115, n. 18, p. 4096–4103, 2009.
- MARCHAL, Juan Antonio *et al.* Bozepinib, a novel small antitumor agent, induces PKR-mediated apoptosis and synergizes with IFN α triggering apoptosis, autophagy and senescence. **Drug design, development and therapy**, [s. l.], v. 7, p. 1301–1313, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194639>.
- MARTINEZ RODRIGUEZ, Roberto Hugo; BUISAN RUEDA, Oscar; IBARZ, Luis. Bladder cancer: Present and future. **Medicina Clinica**, [s. l.], v. 149, n. 10, p. 449–455, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2017.06.009>.
- MCCONKEY, David J. *et al.* Therapeutic Opportunities in the Intrinsic Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 377–394, 2015.
- MIYAZAKI, Jun *et al.* Adverse reactions related to treatment compliance during BCG maintenance therapy for non-muscle-invasive bladder cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 827–834, 2013.
- MOCH, Holger *et al.* The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. **European Urology**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 93–105, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>.

- MULLER, Patrick Y; MILTON, Mark N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. **Nature reviews. Drug discovery**, England, v. 11, n. 10, p. 751–761, 2012.
- MUSHTAQ, Jameel; THURAIRAJA, Ramesh; NAIR, Rajesh. Bladder cancer. **Surgery (United Kingdom)**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 529–537, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.07.003>.
- PANDA, Prashanta Kumar *et al.* Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 39, p. 43–55, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.013>.
- PERROT, Ivan *et al.* Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. **Cell Reports**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 2411-2425.e9, 2019.
- PEYTON, Charles C *et al.* Updates on the use of intravesical therapies for non-muscle invasive bladder cancer: how, when and what. **World journal of urology**, Germany, v. 37, n. 10, p. 2017–2029, 2019.
- POWLES, Thomas *et al.* A comparison of the platinum analogues in bladder cancer cell lines. **Urologia Internationalis**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 67–72, 2007.
- QU, Kai *et al.* Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells. **Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University**, China, v. 33, n. 9, p. 1253–1259, 2013.
- QUISPE M, Angel *et al.* Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 265–269, 2006. Disponível em: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342006000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 24 jan. 2023.
- RAFFRAY, L. *et al.* Hépatite granulomateuse révélant une infection disséminée à *Mycobacterium bovis* après BCG-thérapie intravésicale. **Revue de Medecine Interne**, [s. l.], v. 36, n. 9, p. 626–630, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2014.10.361>.
- RAMÍREZ, Alberto *et al.* HER2-signaling pathway, JNK and ERKs kinases, and cancer stem-like cells are targets of Bozopinib small compound. **Oncotarget**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 3590–3606, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24946763>.
- REN, Zhen-Hu *et al.* CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. **Oncotarget**, United States, v. 7, n. 38, p. 61690–61702, 2016.
- REN, Fei; SHENG, Wei Qi; DU, Xiang. CD133: A cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 19, n. 17, p. 2603–2611, 2013.
- ROCKENBACH, Liliana *et al.* Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urologic oncology**, United States, v. 31, n. 7, p. 1204–1211, 2013.

- ROCKENBACH, Liliana *et al.* NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. **Purinergic signalling**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 421–430, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24464643>.
- ROH, Meejeon *et al.* Targeting CD73 to augment cancer immunotherapy. **Current opinion in pharmacology**, England, v. 53, p. 66–76, 2020.
- ROYCE, Trevor J. *et al.* Comparative Effectiveness of Bladder-preserving Tri-modality Therapy Versus Radical Cystectomy for Muscle-invasive Bladder Cancer. **Clinical Genitourinary Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 23-31.e3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.09.023>.
- SAMAAN, Tala M.Abu *et al.* Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. **Biomolecules**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1–22, 2019.
- SCHULIEN, Isabel *et al.* Extracellular ATP and purinergic P2Y2 receptor signaling promote liver tumorigenesis in mice by exacerbating DNA damage. **Cancer Research**, [s. l.], v. 80, n. 4, p. 699–708, 2020.
- SHEN, Xian; ZHAO, Bin. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: Meta-analysis. **BMJ (Online)**, [s. l.], v. 362, p. 1–9, 2018.
- SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018.
- SOLEIMANI, Atena *et al.* Emerging roles of CD133 in the treatment of gastric cancer, a novel stem cell biomarker and beyond. **Life sciences**, Netherlands, v. 293, p. 120050, 2022.
- STAGG, John *et al.* Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 107, n. 4, p. 1547–1552, 2010.
- STAGG, John *et al.* CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. **Cancer research**, United States, v. 72, n. 9, p. 2190–2196, 2012.
- STAGG, John *et al.* CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. **Cancer research**, United States, v. 71, n. 8, p. 2892–2900, 2011.
- STELLA, Joséli *et al.* Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 260–267, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.01.035>.
- STONE, Louise. Gemcitabine reduces recurrence. **Nature Reviews Urology**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 466, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41585-018-0033-x>.
- SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, United States, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

- TABER, Ann *et al.* Molecular correlates of cisplatin-based chemotherapy response in muscle invasive bladder cancer by integrated multi-omics analysis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18640-0>.
- TAKAI, Erina *et al.* Autocrine signaling via release of ATP and activation of P2X7 receptor influences motile activity of human lung cancer cells. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 487–497, 2014.
- TRYBUS, Wojciech *et al.* Phycion Induces Potential Anticancer Effects in Cervical Cancer Cells. **Cells**, Switzerland, v. 10, n. 8, 2021.
- ULAMEC, Monika *et al.* New Insights into the Diagnosis, Molecular Taxonomy, and Treatment of Bladder Cancer. **Acta medica academica**, Bosnia and Herzegovina, v. 50, n. 1, p. 143–156, 2021.
- VAN OSCH, Frits H.M. *et al.* Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: A meta-analysis of 89 observational studies. **International Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 857–870, 2016.
- WEAVER, Beth A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 2014.
- WERNTZ, Ryan P.; ADAMIC, Brittany; STEINBERG, Gary D. Emerging therapies in the management of high-risk non-muscle invasive bladder cancer (HRNMIBC). **World Journal of Urology**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 2031–2040, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2592-0>.
- WU, Xian-Rui *et al.* High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. **Journal of surgical oncology**, United States, v. 106, n. 2, p. 130–137, 2012.
- WU, Yilun *et al.* PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy—blockade, knockdown, or inhibition. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. AUG, 2019.
- XIA, Jiyi *et al.* P2X7 receptor stimulates breast cancer cell invasion and migration via the AKT pathway. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 103–110, 2015.
- XU, Yadong *et al.* Application of nanotechnology in the diagnosis and treatment of bladder cancer. **Journal of nanobiotechnology**, England, v. 19, n. 1, p. 393, 2021.
- XU, Jingwen; GEWIRTZ, David A. Is Autophagy Always a Barrier to Cisplatin Therapy?. **Biomolecules**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–22, 2022.
- XU, Xuebo; LAI, Yueyang; HUA, Zi-Chun. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. **Bioscience reports**, England, v. 39, n. 1, 2019.
- YANG, Hui *et al.* Extracellular ATP promotes breast cancer chemoresistance via HIF-1 α signaling. **Cell death & disease**, England, v. 13, n. 3, p. 199, 2022.

YU, Weiqun; ROBSON, Simon C; HILL, Warren G. Expression and distribution of ectonucleotidases in mouse urinary bladder. **PloS one**, United States, v. 6, n. 4, p. e18704, 2011.

ZHANG, Jiang Lan *et al.* ATP-P2Y2- β -catenin axis promotes cell invasion in breast cancer cells. **Cancer Science**, [s. l.], v. 108, n. 7, p. 1318–1327, 2017.

ZHOU, Xuerui *et al.* Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. **Oncology reports**, Greece, v. 17, n. 6, p. 1341–1346, 2007.

ZHOU, Yihong *et al.* The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. **Oncotarget**, United States, v. 8, n. 30, p. 48755–48768, 2017.

ZIMMERMANN, Herbert; ZEBISCH, Matthias; STRÄTER, Norbert. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.

Anexo D: Colaborações

Kagami, L. P., Gonçalves, I. L., **da Silva, Á. C.**, Silva, A. C., das Neves, G. M., Göethel, G., Spillere, A., dos Santos, M. R., Figueiró, F., Garcia, S. C., Ávila, D. S., Battastini, A. M. O., & Eifler-Lima, V. L. (2023). LaSOM 335, active against bladder cancer cells, interferes with *Let-60* (*hRas*) and reduces CD73 expression/activity. *Chemical Biology & Drug Design*, 00, 1–11. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14273>