



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

JANAINA MENDES FERREIRA

**Potencial prognóstico da expressão das proteínas
imunomoduladoras IDO, CD39 e CD73 na progressão do câncer
de bexiga**

SÃO PAULO, SP
2021

JANAINA MENDES FERREIRA

**Potencial prognóstico da expressão das proteínas
imunomoduladoras IDO, CD39 e CD73 na progressão do câncer
de bexiga**

Defesa de Tese a ser apresentada para
aprovação da banca à Universidade Nove
de Julho para obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós-graduação em Medicina.

Orientador: Prof. Humberto Dellê

SÃO PAULO, SP

2021

Ferreira, Janaina Mendes.

Potencial prognóstico da expressão das proteínas imunomoduladoras IDO, CD39 e CD73 na progressão do câncer de bexiga. / Janaina Mendes Ferreira. 2021.

81 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof. Dr. Humberto Dellê

1. IDO. 2. CD39. 3. CD73. 4. Carcinoma de bexiga. 5.

Biomarcadores.

1. Dellê, Humberto. II. Título.

CDU 616



São Paulo 24 de março de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **JANAINA MENDES FERREIRA**

Título da tese: **POTENCIAL PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS
IMUNOMODULADORAS IDO, CD39 CD73 NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE BEXIGA.**

Presidente: PROF. DR. HUMBERTO DELLÊ _____

Humberto Dellê

Membro: PROFA. DRA. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES _____

Maria Fernanda Destro Rodrigues

Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER _____

Stella Regina Zamuner

Membro: PROFA. DRA. ANA CAROLINA RAMOS MORENO _____

Ana Carolina Ramos Moreno

Dedico este trabalho à minha querida família, aos meus amigos que estão sempre presente na minha vida e aqueles amigos e parentes que já partiram dessa vida, mas que nunca deixaram de olhar por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, força e superação que me fizeram chegar até aqui.

Agradeço a Universidade Nove de Julho – UNINOVE pela oportunidade de conquistar mais este degrau em minha jornada acadêmica.

Ao meu orientador professor Humberto Dellê por sua dedicação e atenção ao meu trabalho, ao professor José Pontes Júnior por sua colaboração imprescindível, ao Professor Cleber Camacho por suas pontuais e prestativas observações, a professora Ana Carolina Moreno por aceitar o convite para a banca, a professora Maria Fernanda Setubal Destro Rodrigues por sua atenção e correções tão valiosas e a professora Stella Regina Zamuner por ser um exemplo e ter me acolhido e dado suporte em momentos importantes nessa jornada.

Agradeço a minha família que tanto me compreendeu e apoiou em todas as fases deste estudo, principalmente a minha mãe Lurdes, minha tia Suely, meu tio Paulo (*in memoriam*) e meu tio Francisco por seu amor incondicional, seu exemplo e sua paciência nos momentos mais difíceis.

Agradeço de modo especial aos meus colegas de bancada e de trabalho que sempre me apoiaram, seja com uma mão, uma palavra ou com um café. Luiz Henrique, Chrisna, Camila Maria, Camila Malta, Diego e Bruno, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço as secretárias Juliana e Camila que sempre me ajudaram com a parte burocrática e todos os outros professores que de alguma forma colaboraram.

À minha querida Elaine que me trouxe de volta a UNINOVE, aos meus amigos Fabilene, Rodrigo, Rômulo e Mirian que sempre estiveram do meu lado compreendendo todas as minhas faltas por dedicação ao trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

RESUMO	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Epidemiologia	15
1.2 Subtipos histológicos e estadiamento	16
1.3 Aspectos e alterações celulares no Câncer de Bexiga	17
1.4 Etiologia	19
1.5 Diagnóstico	20
1.6 Tratamento do CBNMI	21
1.7 Prognóstico	27
1.8 Tratamento de CBMI	29
1.9 Biomarcadores e sistema imunológico	30
1.10 Ponteciais Biomarcadores	34
1.10a Ectonucleosidades - CD39 e CD73	35
1.10b Indoleamina 2,3 dioxigenase-1 (IDO1)	38
1.11 Racional para o estudo de imunomoduladores e CB	40
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Desenho do Estudo	43
3.2 Espécimes de CB	43
3.3 Microarranjo tecidual	44
3.4 imunohistoquímica para IDO, CD39 e CD73	47
3.5 Padronização da IH para IDO, CD39 e CD73	48
3.6 Análise estatística	51
4. RESULTADOS	52
4.1. Seleção dos pacientes	52
4.2 Expressão de IDO1 em espécimes humanas de CB	54
4.3 Expressão de CD39 em espécimes humanas de CB	56
4.4 Expressão de CD73 em espécimes humanas de CB	57
4.5 Correlação entre IDO, CD39 e CD73	58
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Lista de Figuras

Figura 1.....	24
Figura 2.....	32
Figura 3.....	43
Figura 4.....	43
Figura 5.....	44
Figura 6.....	47
Figura 7.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1.....	51
Tabela 2.....	52
Tabela 3.....	53
Tabela 4.....	55
Tabela 5.....	56
Tabela 6.....	57
Tabela 7.....	58
Tabela 8.....	57

Lista de Abreviaturas

CBMI – Câncer de Bexiga Músculo Invasivo
CBNMI – Câncer de Bexiga Não Músculo Invasivo
ADP – Adenosina Difosfato
AMP – Adenosina Monofosfato
ATP – Adenosina Trifostato
BCG – Bacilo Calmette-Guerin.
CB – Câncer de Bexiga
CCT – Carcinoma de Células de Transição
CD – *Cluster of Differentiation*
CD39 – Ecto-nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase – 1
CD-73 – Ecto-5'-nucleotidase
CIS – Carcinoma *in situ*
CR – Cistectomia Radical
CT – Células Tumorais
DAB – 3,3'-Diaminobenzidine
FDA – *Food and Drugs Administration*
FISH – *Fluorescent in situ hybridization*
GAGs – Glicosaminoglicanos
IC – Intervalo de Confiança
IDO – Indoleamina 2,3 dioxigenase.
IL – Interleucina
INCA – Instituto Nacional do Câncer
INF γ – Interferon Gama
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MT – 1-metil-D-Triptofano
NK – *Natural Killer*
OR – *Odds Ratio*
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PCI – Ponto de controle imune
PCR – Reação de Cadeia de Polimerase
qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

RNA – Ácido Ribonucleico

RTU – Ressecção Transuretral

TAN – Tecidos Adjacentes Normais

Tis – Tumor “*in situ*”

TLR – *Toll Like Receptor*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNM – Estadiamento dos tumores malignos - Tumor primário, linfonodo e metástase

RESUMO

Introdução: O câncer de bexiga (CB) é o segundo tumor mais comum do sistema urinário. Embora 75% dos casos tenham apresentação inicial não músculo-invasiva (CBNMI) e possam ser tratados curativamente com preservação do órgão através da ressecção endoscópica, cerca de 75% apresentam recorrência e 20% evoluem para a forma músculo-invasiva (CBMI). A imunoterapia com BCG intravesical é utilizada como terapia adjuvante e reduz em 50% a recorrência e a progressão tumoral, porém a outra metade dos casos ainda apresentará a recidiva da neoplasia. Já o CBMI é tratado pela cistectomia radical e quimioterapia neoadjuvante, porém nesse estágio o tratamento apresenta alta morbidade perioperatória e a sobrevida em 5 anos é de apenas 50%. Os resultados promissores de imunoterapias têm incentivado novos alvos. A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima que apresenta ação imunomoduladora em mecanismos fisiológicos importantes evitando resposta exacerbada do sistema imune. A IDO também é expressa em tumores onde atua inibindo atividade linfocitária e promovendo assim o escape imunológico. As proteínas CD39 e CD73 também apresentam ação imunossupressora e assim como a IDO têm ação oncogênica, por favorecer o escape imunológico da célula neoplásica. Embora o papel da IDO, CD39 e CD73 ainda não esteja plenamente estabelecido, a expressão destas moléculas possam ter potencial no prognóstico no CB. **Objetivos:** Avaliar a expressão proteica da IDO, CD73 e CD39 em espécimes cirúrgicos de CBNMI e CBMI e correlacionar com parâmetros clinicopatológicos. **Material e métodos:** Selecionamos retrospectivamente 88 pacientes com CBNMI tratados por ressecção endoscópica e BCG adjuvante que apresentaram ou não recidiva da doença durante o seguimento pós-operatório no Hospital Brigadeiro entre 2012 e 2017. Avaliamos também a expressão destes marcadores em série de 77 pacientes com CBMI tratados por cistectomia radical no mesmo período e local. A expressão proteica foi avaliada semiquantitativamente por imunohistoquímica em *Tissue Micro Array* contendo três amostras por caso. Correlacionamos a expressão destas proteínas com o grau tumoral, o estágio patológico, recidiva, tabagismo, tratamento e progressão da doença. **Resultados:** Dos 162 pacientes que ofereceram amostras viáveis, 129 eram homens (79,6%) e 33 eram mulheres (20,4%). A maioria era formada por idosos (70,4% >65 anos) e fumantes (79,5%). Quanto ao grau histológico, 74% dos pacientes eram de alto grau e 26% de baixo grau. A alta expressão de IDO1 correlacionou-se com um estadió precoce (CBNMI x CBMI) e com pacientes submetidos à RTU (RTU x CR) ($p < 0,001$). A alta expressão de CD39 foi associada ao CBMNI ($p < 0,001$), ao estadió de menor grau (Ta, T1 x T2, T3 e T4) e ao tratamento RTU (RTU x CR) ($p < 0,001$). Em relação à CD73, não foram associadas características clínico-patológicas. No entanto, quando combinado à expressão de CD39, a baixa expressão de CD39 e CD73 foi associada à CB avançada. Em relação ao tratamento, a alta expressão de ambas se apresentou nos pacientes submetidos a RTU em contraste com a baixa expressão de ambas no CR ($p < 0,001$). Por fim a análise da correlação entre a associação da expressão de IDO, CD39 e CD73 demonstrou-se significativa ($p < 0,002$). **Conclusão:** Propomos que a análise das enzimas IDO, CD39 e CD73, podem ser biomarcadores complementares no prognóstico do CB.

Palavras-Chave: IDO, CD39, CD73, carcinoma de bexiga, biomarcadores, prognóstico

Abstract

Introduction: Bladder cancer (BC) is the second most common tumor of the urinary system. Although 75% of cases have an initial non-muscle-invasive presentation (NMIBC) and can be treated curatively with organ preservation through endoscopic resection, about 75% present with recurrence and 20% progress to the muscle-invasive form (MIBC). Immunotherapy with intravesical BCG is used as an adjuvant therapy and reduces tumor recurrence and progression by 50%, but the other half of the cases will still have a recurrence of the neoplasm. MIBC, on the other hand, is treated by radical cystectomy and neoadjuvant chemotherapy, but at this stage the treatment has high perioperative morbidity and the 5-year survival is only 50%. The promising results of immunotherapies have encouraged new targets. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme that has immunomodulatory action in important physiological mechanisms, preventing an exacerbated response of the immune system. IDO is also expressed in tumors where it acts by inhibiting lymphocytic activity and thus promoting immune escape. CD39 and CD73 proteins also have immunosuppressive action and, like IDO, they have oncogenic action, as they favor the immune escape of the neoplastic cell. Although the role of IDO, CD39 and CD73 is not yet fully established, the expression of these molecules may have prognostic potential in BC. **Objectives:** To evaluate the protein expression of IDO, CD73 and CD39 in surgical specimens of CBNMI and CBMI and to correlate with clinicopathological parameters. **Material and methods:** We retrospectively selected 88 patients with NIMBC treated by endoscopic resection and adjuvant BCG who had or did not have disease recurrence during the postoperative follow-up at Hospital Brigadeiro between 2012 and 2017. We also evaluated the expression of these markers in a series of 77 patients with CBMI treated by radical cystectomy at the same time and location. Protein expression was evaluated semiquantitatively by immunohistochemistry in Tissue Micro Array containing three samples per case. We correlated the expression of these proteins with tumor grade, pathological stage, recurrence, smoking, treatment and disease progression. **Results:** Of the 162 patients who offered viable samples, 129 were men (79.6%) and 33 were women (20.4%). Most were elderly (70.4% >65 years old) and smokers (79.5%). As for the histological grade, 74% of the patients were of high grade and 26% of low grade. The high expression of IDO1 correlated with an early stage (NMIBC x MIBC) and with patients undergoing TUR (RTU x CR) ($p < 0.001$). The high expression of CD39 was associated with NMIBC ($p < 0.001$), the lower grade stage (Ta, T1 x T2, T3 and T4) and the RTU treatment (RTU x CR) ($p < 0.001$). Regarding CD73, no clinical-pathological characteristics were associated. However, when combined with CD39 expression, low expression of CD39 and CD73 was associated with advanced BC. Regarding the treatment, the high expression of both was present in patients submitted to TUR in contrast to the low expression of both in the CR ($p < 0.001$). Finally, the analysis of the correlation between the association of IDO, CD39 and CD73 expression proved to be significant ($p < 0.002$). **Conclusion:** We propose that the analysis of IDO, CD39 and CD73 enzymes may be complementary biomarkers in the prognosis of BC.

Keywords: IDO, CD39, CD73, bladder carcinoma, biomarkers, prognosis

1. INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga (CB) é uma das neoplasias mais comuns do sistema urinário e apresenta alta taxa de recorrência e progressão mesmo após a ressecção transuretral (RTU) associada à imunoterapia com BCG (Witjes et al., 2017). Embora 75% dos casos tenham apresentação inicial não músculo-invasiva (CBNMI) e possam ser tratados curativamente com preservação do órgão através da ressecção transuretral, cerca de 75% apresentam recorrência e 20% evoluem para a forma músculo-invasiva (CBMI) (Witjes et al., 2017). A imunoterapia com BCG intravesical é utilizada como terapia adjuvante e reduz em 50% a recorrência e a progressão tumoral, porém a outra metade dos casos ainda apresentará a recidiva da neoplasia. Desta maneira, ferramentas que possam auxiliar no prognóstico desta neoplasia no sentido de prever a progressão da doença são de extrema importância (Witjes et al., 2017).

Assim como ocorre em tumores de diversos órgãos, o tumor de bexiga desenvolve-se por meio de escape imunológico, o que torna a imunoterapia uma área em crescente potencial. A imunomodulação promovida pelo tumor é dirigida em grande parte por moléculas específicas que oportunamente surgem em prol da “tolerância” local, desta maneira, a expressão destas moléculas no tecido tumoral pode indicar como será a evolução da doença em organismos imunocompetentes. O presente estudo teve como foco a investigação de três moléculas com potencial imunomodulador em espécimes de CB, a fim de correlacioná-las com a gravidade da doença. Uma delas, a indoleamina 2,3-dioxigenase-1 (IDO1), é uma enzima envolvida no catabolismo do triptofano, enquanto as outras duas, a CD39 e a CD73, são ectonucleotidases envolvidas no catabolismo nucleotídico.

1.1 Epidemiologia

Estima-se que 386.000 novos casos de CB por ano surjam no mundo, colocando a neoplasia como a sétima mais comum (Siegel et al., 2020). Nos EUA, o CB está no 4º lugar em termos de incidência e em 8º como causa de morte nos homens (Siegel et al., 2020). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam que em 2020 teremos no Brasil 10.640 novos casos, sendo 7.590 em homens e 3.050 em mulheres. Foram também registradas 4.355 mortes em 2017, sendo 3.021 homens e 1.334 mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 6,43 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a sétima posição; e de 2,63 para cada 100 mil mulheres, ocupando a 14ª posição (INCA, 2020).

A taxa de incidência mundial padronizada por idade prevista é de 9,0 para homens e 2,2 para mulheres (por 100.000 pessoas / ano) (Phillips et al., 2009). Já na União Européia, a taxa de incidência padronizada por idade prevista é praticamente o dobro, sendo de 19,1 para homens e de 4,0 para mulheres. (Ferlay et al., 2013).

Em todo o mundo, a taxa de mortalidade padronizada por idade prevista de CB (por 100.000 pessoas / ano) foi de 3,2 para homens versus 0,9 para mulheres (Phillips et al., 2009). A incidência de CB e as taxas de mortalidade variam de acordo com os países devido a diferenças nos fatores de risco, detecção e práticas de diagnóstico e disponibilidade de tratamentos. As variações são, no entanto, parcialmente causadas pelas diferentes metodologias utilizadas e pela qualidade da coleta de dados (Ferlay et al., 2013).

Aproximadamente 75% dos pacientes com CB apresentam a forma CBNMI, onde o tumor encontra-se confinado à mucosa (estágio Ta, CIS) ou submucosa (estágio T1); os outros 25% concentram os casos T2, T3 e T4 onde os tumores

apresentam-se como CBMI (Bosetti et al., 2011). Os pacientes com Ta, T1 e CIS são os mais prevalentes, devido à maior sobrevida a longo prazo nesse estágio em comparação aos tumores T2, T3 e T4 (Phillips et al., 2009; Ferlay et al., 2013).

1.2 Etiologia

O tabagismo é o fator de risco mais importante, respondendo por aproximadamente 50% dos casos (Phillips et al., 2009; Ferlay et al., 2013; Chavan et al., 2014). A fumaça do tabaco contém aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que têm excreção renal. Indivíduos tabagistas apresentam incidência de CB até quatro vezes maior em comparação com não-fumantes e a redução deste risco leva até 20 anos para ocorrer a partir da cessação do hábito (Gandini et al, 2008).

O segundo fator de risco mais importante para o CB é a exposição ocupacional a aminas aromáticas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e hidrocarbonetos clorados, que representam 20% dos casos. Este tipo de exposição ocupacional ocorre principalmente em plantas industriais, que processam tintas, metais e produtos petrolíferos (Phillips et al., 2009; Freedman et al., 2011; Ferlay et al., 2013;). Em países desenvolvidos, esses riscos foram reduzidos pelas diretrizes de segurança do trabalho, portanto, os trabalhadores químicos já não têm maior incidência de CB em comparação com a população em geral (Freedman et al., 2011; Ferlay et al., 2013; Steinmaus et al., 2014). Outro fator de risco para o CB é o consumo de grandes quantidades do analgésico fenacetina e de ciclofosfamida (Piper et al, 1985; Fernandes et al., 1996; Messing et al., 2002).

A história familiar parece ter pouco impacto e, até o momento, não foi demonstrada qualquer evidência de mutações em genes de susceptibilidade ou

polimorfismos associados à maior chance do tumor, portanto inexitem síndromes hereditárias de CB (Brennan et al., 2000; Ferlay et al., 2013). Talvez a predisposição genética possa ter influência na maior incidência de CB através do seu impacto na susceptibilidade aos outros fatores de risco já citados (Brennan et al., 2000; Ferlay et al., 2013).

Embora o significado da ingestão de líquidos seja incerto, a cloração da água potável e os níveis subsequentes de trihalometanos são potencialmente cancerígenos, também a exposição ao arsênio na água potável aumenta o risco (Pashos et al., 2002; Ferlay et al., 2013). A associação entre uso pessoal de corante e risco permanece incerta; um risco aumentado foi sugerido nos usuários de corantes capilares permanentes com um fenótipo de acetilação NAT-2 lento (enzima responsável pelo metabolismo e inativação da isoniazida no organismo humano) (Ferlay et al., 2013). Os hábitos alimentares parecem ter pouco impacto (Rushton et al., 2010; Ferlay et al., 2013). A esquistossomose, uma cistite endêmica crônica baseada em infecção recorrente com um trematóde parasítico, também é uma causa de CB e por último, podemos associar a exposição a radiações ionizantes a um maior risco. (Ferlay et al., 2013).

1.3 Subtipos histológicos e estadiamento

O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células transicionais, também denominado carcinoma urotelial, que representa mais de 90% dos casos de CB (Siegel et al, 2020). Outros tipos histológicos compreendem cerca de 3% a 7% dos casos de CB e são representados pelo adenocarcinoma que geralmente representa os tumores localizados no úraco e o carcinoma espinocelular ou de células escamosas cuja carcinogênese está associada à irritação crônica por cálculo, cateter

vesical permanente, infecção urinária ou à infecção crônica por *Schistosoma haematobium* (especialmente em países norte-africanos) (Messing et al., 2002).

Apesar da forma mais frequente ser a CBNMI que representa 75% dos casos, aproximadamente um terço destes evoluem para CBMI, a qual apresenta maior chance de disseminação à distância e mortalidade (Witjes et al., 2017). Os CBNMI incluem, por definição, tumores Ta, que são aqueles com aspecto papilíferos e estão restritos ao epitélio, T1 (quando o tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial) e Tis que é o carcinoma *in situ*. A dicotomização em tumores não invasivos versus invasivos é importante, pois determina a conduta terapêutica, enquanto nos CBNMI a preservação da bexiga é possível, no CBMI a remoção radical do órgão se faz necessária para o tratamento curativo (Witjes et al., 2017).

O CBMI é definido pela presença de invasão pelo tumor da camada muscular própria, o que classifica o estágio como T2; se o tumor se estender até a adventícia e o tecido perivesical, ele é classificado como T3; e como T4 quando houver invasão de órgãos adjacentes como próstata, útero, vagina, parede abdominal. A disseminação à distância ocorre por via hematogênica e linfática, sendo nesta última primariamente para os linfonodos pélvicos e subsequentemente para os linfonodos da cadeia retroperitoneal. O estadiamento locoregional e a disseminação metastática obedecem a 8ª edição da classificação TNM / UICC (Brierley; Gospodarowicz; Wittekind, 2016).

Em relação a definição e caracterização do CB em alto grau ou baixo grau, uma nova classificação em 1998 foi proposta pela World Health Organization (WHO) e pela International Society of Urological Pathology (ISUP) e permanece até os dias atuais. Entre outras mudanças, a principal diferença foi o agrupamento dos tumores: grau I – carcinoma urotelial papilífero de baixo grau e graus 2 e 3 – carcinoma

papilífero de alto grau. Com relação ao prognóstico, tumores de alto grau apresentam maior probabilidade de recidiva e progressão e, portanto, de piores prognósticos quando comparados aos de baixo grau histológico. (Epstein, 2003; MacLennan et al., 2007; Matheus, 2012).

1.4 Aspectos e alterações celulares no Câncer de Bexiga

Além das alterações fisiológicas no desenvolvimento do tumor, existem várias alterações imunológicas notáveis que ocorrem simultaneamente. As alterações podem ser fenotípicas de natureza, tais como a perda ou adição de certas moléculas na superfície das células uroteliais. Já em relação ao complexo de histocompatibilidade (do inglês Major Histocompatibility Complex MHC) pelos antígenos e outras moléculas de adesão celular que são expressas sobre a superfície das células normais, tendem a ter uma expressão variável em células cancerosas da bexiga. (Coon et al, 1982; Hirohashi et al, 1985). Também tem sido observado que a perda de antígenos do grupo sanguíneo aumenta de maneira irreversível com a progressão do tumor. A classe I do antígeno dos leucócitos humanos (ALH), também conhecida como antígeno de MHC de classe I, é normalmente expressa na superfície das células uroteliais, no entanto, em malignidades uroteliais, tem sido observado que existe uma perda de ALH de classe A, B e expressão de C (Korthals et al, 1981; Turbitt et al, 1981). Tal perda de MHC de classe I correlaciona-se também com a expressão do antígeno na progressão do tumor e moléculas como CD44 e ICAM-1, que normalmente promovem a adesão e ativação dos linfócitos T e por consequência tem sua expressão diminuída em células do Câncer de bexiga (Graham, 1992; Hart et al, 1991).

Células do sistema imunológico inato, conhecidas como células natural killer (NK), obtidas a partir de células circulantes do sangue periférico de pacientes com câncer de bexiga, foram estudadas em 67 pacientes e 29 doadores saudáveis. Uma diminuição da atividade de células NK em pacientes foi observada em comparação com as saudáveis, observou-se também que a recorrência da doença estava associada com a diminuição da atividade de células NK (Carballido et al, 1990). Outro fator que parece influenciar a resposta imunológica ao câncer de bexiga é a arquitetura celular. Em um estudo de Dangles et al, o impacto das mudanças físicas na arquitetura celular na ativação de linfócitos T autólogos foi examinado, duas linhas de células de carcinoma da bexiga autólogas foram usadas como alvos para linfócitos T na produção de citocinas, as linhagens de células foram cultivadas com geometria variável, incluindo uma monocamada celular bidimensional e uma tridimensional. Curiosamente, verificou-se que houve uma redução na produção de citocinas pelas células T após a interação com a estrutura tridimensional de células de tumor em comparação com a estrutura bidimensional, o que nos leva a entender que o microambiente tumoral parece também desempenhar um papel na arquitetura celular gerada (Dangles et al., 2002).

1.5 Diagnóstico

No diagnóstico primário, os sintomas são os primeiros a serem avaliados, dentre eles a hematúria indolor é a queixa mais comum. Outros sinais clínicos incluem urgência, disúria e aumento da frequência urinária. Em tumores mais avançados, dor pélvica e sintomas relacionados à obstrução do trato urinário são evidenciados (Witjes et al., 2017). Os exames de imagem que levam a suspeita de CB são a ultrassonografia, a tomografia computadorizada ou ressonância de pelve e o sinal

típico é o de uma lesão vegetante intravesical. A citologia urinária é outra ferramenta diagnóstica que observa a presença de células cancerígenas na urina e possui alta sensibilidade em tumores de alto grau (Witjes et al., 2017).

Independente da técnica de imagem que identificou a massa vesical ou do resultado da citologia, os pacientes devem ser submetidos à avaliação endoscópica da bexiga seja com cistoscopia com biópsia ou ressecção endoscópica para diagnóstico histopatológico. A cistoscopia que é considerada por muitos como o método padrão para o diagnóstico e acompanhamento do CB pode falhar na detecção de cerca de 25% dos tumores de pequenas dimensões e do Tis (Kriegmair et al., 1999). A ressecção transuretral endoscópica (RTU) tem como objetivo permitir não só o diagnóstico histopatológico, mas também o estadiamento, pois ao contrário da biópsia que avalia apenas superficialmente a lesão, a RTU consegue amostrar também a camada muscular, possibilitando a classificação dos tumores em CBNMI versus CBMI. Naqueles não invasivos, a ressecção tem a vantagem adicional de já realizar o tratamento curativo no mesmo ato (Burger et al., 2013).

1.6 Tratamento do CBNMI

A RTU é o método padrão para o tratamento do tumor não invasivo, porém cerca de 70% dos casos apresentam recorrência e 20% apresenta progressão para tumor invasivo após a ressecção (Cina et al., 2001). Para melhorar este resultado, recomenda-se a terapia intravesical adjuvante com quimioterápicos ou BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) (Witjes et al., 2017). Embora os quimioterápicos tenham ação na redução da recorrência, como a mitomicina instilada imediatamente após a ressecção de tumores de baixo grau, os melhores resultados são observados com a instilação do BCG. Estudos clínicos em tumores papilares mostram redução de 40% na

recorrência do tumor em pacientes tratados com BCG versus 14% naqueles tratados com quimioterápicos intravesicais (Di Stasi et al., 2006). Nos casos com maior risco de recidiva ou progressão, que são representados por tumores estágio pT1; Tis ou alto grau, recomenda-se a terapia adjuvante com BCG, que mostrou, em estudo randomizado multicêntrico, uma redução de 50% na chance de recorrência (Babjuk et al., 2013).

A descoberta da ação do BCG como agente terapêutico para o câncer remonta os anos 60, quando um estudo epidemiológico americano demonstrou que bebês vacinados com BCG tinham baixa incidência de leucemia (Rosenthal et al., 1972). Morales e colaboradores em 1976 descreveram os primeiros resultados positivos do BCG intravesical no tratamento do CB urotelial, quando observaram redução dos tumores de bexiga em 9 pacientes tratados (Morales et al., 1976); este e outros estudos levaram a FDA (*Food and Drugs Administration*) em 1990 a liberar o uso adjuvante do BCG intravesical no CBNMI. No protocolo convencional, 120 mg de BCG são reconstituídos em 50ml de solução salina e este volume é instilado na bexiga através de um cateter transuretral. A solução permanece duas horas na bexiga e esse processo é repetido uma vez por semana durante 6 semanas. O protocolo de manutenção prevê ainda três aplicações semanais que são repetidas a cada 6 meses por 3 anos (Witjes et al., 2017).

Na terapia intravesical, geralmente assume-se que a ligação intraluminal do BCG às células uroteliais ou as células de câncer de bexiga é o primeiro passo na resposta imunitária. O urotélio normal é coberto com os glicosaminoglicanos (GAGs), que, devido à sua carga negativa sugere-se que proteja o urotélio do BCG e de outras bactérias, nos quais as superfícies são altamente carregadas negativamente (Poggi et al, 2000). Isto pode explicar por que uma alta dose de BCG é necessária para a

terapia intravesical. Além desta interação físico-química, a fixação do BCG também é mediada por fibronectina, uma glicoproteína de matriz extracelular, que é distribuída no urotélio normal e no maligno. Esta mediação é considerada um passo importante porque um anticorpo anti-fibronectina pode inibir a atividade antitumoral do BCG (Kavoussi et al, 1990).

Segundo Maksymowych e Kane, a inserção de bactérias, incluindo o BCG modula o processamento de antígenos presentes (Maksymowych & Kane, 2000). Curiosamente, a BCG também pode aumentar a expressão na superfície do complexo de histocompatibilidade de classe II e CD1 de células cancerígenas da bexiga (Ikeda et al., 2002). Lattime e colaboradores relataram que as células de câncer de bexiga de murino apresentaram o antígeno específico do BCG nas células T CD4+. Estas observações sugerem que não só as CAPs, mas também células uroteliais infectadas pelo BCG e as células cancerígenas da bexiga podem precocemente tomar parte na iniciação da resposta imunitária (Lattime et al., 1992).

Burger e colaboradores demonstraram em uma meta-análise de seis estudos, incluindo 585 pacientes com BCG versus RTU do tumor isolado mostrou que o BCG reduziu em 56% a taxa de recorrência do tumor. O maior benefício foi observado em grupos de alto risco quando foram utilizados pelo menos um ano de terapia de manutenção (Burger et al., 2013).

Recentemente, o mecanismo imunoterápico do BCG ficou um pouco melhor compreendido com a identificação dos genes responsáveis pela sua resposta antitumoral, possibilitando a produção de organismos recombinantes capazes de estimular a resposta imune através dos linfócitos T helper 1 (Th1) de forma mais intensa, visando a diminuição da dose a ser empregada e, conseqüentemente, o aparecimento de menos efeitos colaterais (Lee et al., 2004). A resposta imunológica

desencadeada pelo BCG é regida, principalmente, pelas interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 e IL-18; além do IFN- γ , IFN- α 2B e TNF- α . Estas vacinas recombinantes podem ser associadas a agentes potencializadores da resposta imune Th1, tais como, inibidores da cicloxigenase 2 (Cox-2) e quimioterápicos, com efeitos benéficos (Lee et al., 2004).

Embora o efeito antitumoral do BCG seja reconhecido, o mecanismo de ação não é completamente conhecido (Gakis et al., 2016). Estudos com animais mostram que o efeito antitumoral do BCG está ligado a uma resposta imunitária mediada por células (Ratliff, 2000). Ao mesmo tempo, estudo “in vitro” utilizando linhas celulares uroteliais humanas identificam um efeito direto citotóxico e antiproliferativo do BCG (Pryor et al., 1995).

Estudos experimentais demonstraram que a ação antitumoral do BCG pode ser evidenciada por seis a 12 meses após a aplicação (Bohle; Brandau, 2003). A resposta imunológica celular é responsável por esse efeito prolongado e tardio da terapia intravesical. A resposta Th1 promove o desenvolvimento de infiltrados granulomatosos suburoteliais, que exercem papel de órgãos linfóides secundários, ativando as células imunologicamente ativas contra as células tumorais. Linfócitos CD4+ representam o componente celular predominante do granuloma estabelecido, que pode durar até um ano. Estudos demonstram que a presença dos linfócitos T é necessária à resposta imune de inibição do crescimento tumoral (Ratliff et al., 1993). Tanto células T CD4+ quanto CD8+ participam de forma independente na ação antitumoral do BCG, pois a supressão de uma das linhagens é suficiente para inibir a resposta. Podem ser verificados, também, marcadores de resposta imunológica como HLA-DR, CD25, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e complexo maior de

histocompatibilidade - classe II (MHC-II) (Stover et al., 1991; Prescott et al., 1992; Jackson et al., 1995).

Apesar de vários mecanismos propostos, a principal hipótese é de que a instilação intravesical cause uma resposta imunológica citotóxica local que além de combater o BCG atua contra a célula tumoral (Figura 1). Essa hipótese é corroborada por estudos que mostram que após o tratamento com BCG foi observada maior concentração urinária e tecidual de uma vasta gama de citocinas, incluindo as interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, Interferon- γ e fatores de necrose tumoral (TNF- α) produzidos por macrófagos e linfócitos, além de outros fatores que estabelecem uma complexa resposta imunológica à infecção e à regressão tumoral (Fleischmann et al., 1989; Watanabe et al., 2003).

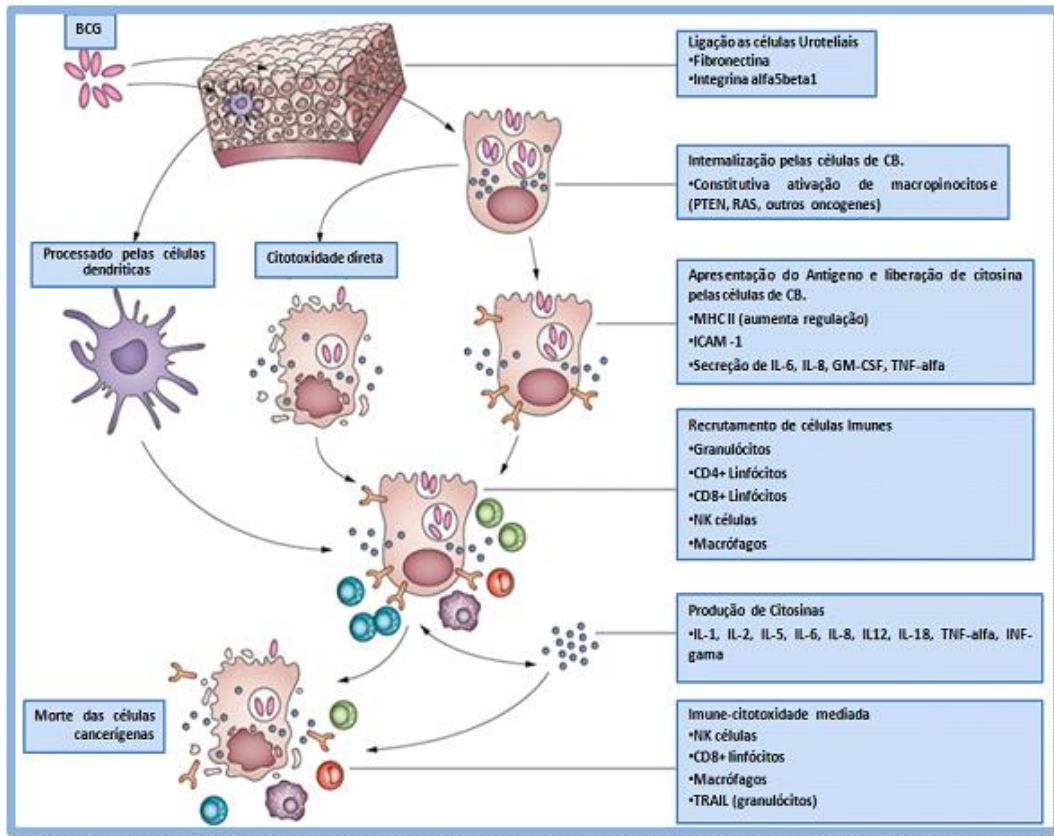


Figura 1. Esquema da resposta citotóxica e imuno-mediada induzida pelo BCG. Adaptado de Redelman-Sidi et al., 2014.

A principal evidência da participação da resposta imune é que a terapia com BCG contra CB não é eficiente em animais com deficiência de células NK (NK do inglês *natural killers*) (Brandau et al., 2001), bem como com deficiência de células polimorfonucleares (Suttmann et al., 2006). Além disso, neutrófilos e macrófagos têm sido apontados como essenciais em mecanismos contra CB (Saint et al. 2001; Luo et al., 2010). Com relação à resposta adquirida, estudos demonstram que o efeito antitumoral da BCG está relacionado com células T, incluindo CD4+ e CD8+. A terapia com BCG não é efetiva em camundongos nude atímicos (Ratliff et al., 1987) e a depleção de CD4+ e CD8+ resulta em perda do efeito antitumoral da BCG (Ratliff et al., 1993).

Embora a terapia adjuvante com BCG tenha mostrado eficácia na redução da recidiva, 30 a 50% dos pacientes não respondem ao tratamento, estando expostos aos riscos de recorrência e progressão do câncer (Sylvester et al., 2006; Zlotta et al., 2009). O diagnóstico da recidiva e da progressão da doença é de vital importância, especialmente quando a CR se faz necessária. Porém, muitas vezes o diagnóstico é tardio, impossibilitando a prevenção da disseminação tumoral e consequente cura do paciente. Dentre as possíveis causas da falha do BCG incluem-se dose baixa, doença invasiva, metástase oculta, resposta imune inadequada ou tumor refratário (Sylvester et al., 2006; Zlotta et al., 2009; Janaszek-Seydlitz et al., 2014).

Adicionalmente, a terapia intravesical com BCG não está livre de complicações graves como a septicemia pelo próprio BCG, uma vez que a vacina contém uma cepa viva atenuada da micobactéria (*Mycobacterium bovis*) (Witjes et al., 2017) e, sendo assim, é necessário compreender as respostas imunitárias induzidas pelo BCG para desenvolver uma imunoterapia mais ativa e menos tóxica (Kawai et al., 2013). A identificação de um biomarcador que possibilitasse a identificação precoce dos casos que não irão responder ao tratamento intravesical seria de suma importância, pois não retardaria a indicação da cistectomia radical e evitaria as complicações de um tratamento desnecessário. Após um quarto de século de pesquisa clínica, nenhum fator prognóstico independente para a resposta do CBNMI ao BCG foi identificado.

1.7 Prognóstico

A classificação do grau tumoral junto com o estadiamento e o tamanho do tumor são os principais fatores de prognóstico do CB. Quanto maior o grau e o estágio pior é a sobrevida específica do paciente (Witjes et al., 2017). Séries de CR mostram que a sobrevida livre de recorrência em 5 anos foi de 76% em pacientes com tumores

com estágio pT1, 74% para pT2, 52% para pT3 e 36% para pT4 (Stein et al., 2001). A presença de invasão angiolinfática também é considerada fator de prognóstico e está associada à maior chance de disseminação à distância. Embora esses fatores sejam úteis na prática clínica eles não são perfeitos; por exemplo, o tratamento para os tumores T1 é a ressecção endoscópica com BCG intravesical adjuvante, no entanto, 30% apresentará recorrência ou progressão; e não há fator de prognóstico que possibilite a identificação precoce destes não respondedores, aos quais poderia ser oferecido tratamento agressivo mais precocemente. Ainda nesse sentido, embora o grau seja preditor de pior sobrevida, sabemos que todos os CBMI são de alto grau, o que elimina o poder prognóstico do grau para esses pacientes (Witjes et al., 2017).

Existem muitos estudos sobre biomarcadores moleculares de prognóstico e alguns mostraram que a expressão do p53, claudina, EGFR3 (do inglês: fator de crescimento epidérmico receptor 3) e FGFR3 (do inglês: fator de crescimento dos fibroblastos receptor tipo 3) podem ser usados na tomada de decisões no manejo do CB por estarem associados à pior evolução da neoplasia (Gakis et al., 2016). Dispomos hoje de um teste genético que é empregado no diagnóstico do CB e está comercialmente disponível sob o nome UroVysion®, o qual usa a técnica de *FISH* (do inglês *Fluorescent In Situ Hybridization*) para detectar a presença de aneuploidia dos cromossomos 3, 7, 17 e a perda do locus 9p21 na urina centrifugada, os quais são marcadores de presença de CB. O exame foi liberado pela “*Food and Drug Administration – FDA*” e de acordo com o consenso da Associação Europeia de Urologia, o exame está indicado no diagnóstico e no acompanhamento pós-operatório de pacientes com câncer urotelial de bexiga (Witjes et al., 2017). Apesar dos recentes avanços, nenhum marcador molecular de prognóstico mostrou desempenho suficiente para que seja recomendado seu uso na prática diária.

1.8 Tratamento de CBMI

Aproximadamente 25% dos pacientes apresentam CBMI (Raghavan et al., 2003). O CBMI está associado a uma alta taxa de recidiva e pior prognóstico geral, apesar do emprego de terapias locais e sistêmicas agressivas. Mesmo após a cistectomia radical, a taxa de mortalidade em 5 anos dos pacientes com CBMI permanece entre 50% e 60% (Grossman et al., 2003; Stein et al., 2001).

A cistectomia radical é uma cirurgia de alta complexidade que é considerada o "padrão ouro" para o tratamento do CBMI e geralmente inclui a remoção cirúrgica completa da bexiga e da próstata em homens, e da bexiga, parte ou todo útero, ovários e até parte da vagina em mulheres. A linfadenectomia pélvica é muitas vezes rotineiramente realizada e pode proporcionar benefícios diagnósticos e terapêuticos. As séries contemporâneas descrevem taxas de sobrevida global de 5 anos de 59-66% com cistectomia radical isolada, com sobrevida livre de recidiva variando de 62 a 68% (Stein et al., 2001; Madersbacher et al., 2003). A mortalidade peri-operatória por cistectomia radical diminuiu ao longo do tempo de quase 20% na década de 1960 para 3-7% na série contemporânea (Stein et al., 2001). A incidência de complicações perioperatórias é de 50%, refletindo a complexidade do procedimento (Witjes et al., 2017).

Acredita-se que muitos pacientes já apresentam doença micrometastática no momento do diagnóstico o que explicaria as altas taxas de recorrência após a CR (Witjes et al., 2017). Essa observação levou os pesquisadores a explorar as habilidades de terapias neoadjuvantes ou adjuvantes para melhorar esses resultados. Estudo prospectivo multicêntrico que randomizou pacientes com CBMI para cirurgia versus quimioterapia neoadjuvante à cirurgia, mostrou que a realização de

quimioterapia neoadjuvante à CR estava associada à redução da mortalidade geral de 5% a favor destes pacientes quando comparados aos que realizaram apenas o tratamento cirúrgico (Witjes et al., 2017).

O problema é que nem todos os casos de CBMI respondem a este esquema de quimioterapia neoadjuvante, logo a identificação destes pacientes não respondedores também tem papel importante, pois evitaria tratamento sistêmico desnecessário ou a indicação de radioterapia concomitante; e baseado nos fatores de prognóstico atuais também não é possível a identificação destes casos (Apolo et al., 2012). Espera-se que a descoberta de novos biomarcadores de prognóstico possa melhorar o resultado do tratamento multimodal por permitir melhor seleção dos pacientes para a cirurgia, radioterapia ou quimioterapia; bem como possibilitar o desenvolvimento de novas terapias.

1.9 Biomarcadores e sistema imunológico

Baseado no panorama atual torna-se necessária a descoberta de novos biomarcadores para ampliar as estratégias terapêuticas e a sobrevida dos pacientes com CB. Em relação ao CBNMI, tais marcadores permitiriam identificar previamente os pacientes que não responderão ao BCG intravesical, identificaria os pacientes com pior prognóstico e maior chances de progressão para doença invasiva e possibilitaria a seleção de pacientes para tratamento radical precoce. Em relação ao CBMI, o biomarcador de prognóstico possibilitaria o desenvolvimento de novas terapias alvo e a adoção de tratamento multimodal mais agressivo nos casos de pior prognóstico.

Atualmente, a literatura não permite o uso de nenhum biomarcador para tomada de decisões no CB, e segundo os Consensos das Associações Americana e Européia de Urologia, inexistem marcadores que possam ser empregados na tomada de

condutas para o tratamento do CB (Gakis et al., 2016). Um novo campo na pesquisa de novos biomarcadores é o estudo das interações entre o tumor e o sistema imunológico. Novos marcadores recentemente descritos nestas vias têm possibilitado o desenvolvimento de imunoterapias que têm se tornado cada vez mais utilizada como tratamento padrão ou complementar à quimioterapia em pacientes com diferentes tipos de neoplasia.

A interação entre a célula tumoral e o sistema imune do hospedeiro compreenderia as seguintes três fases: eliminação, equilíbrio e sistema de escape. Na fase de eliminação, o sistema imune é capaz de erradicar o desenvolvimento de células neoplásicas, no entanto, variantes de células tumorais que sobreviveram à fase de eliminação entram na fase de equilíbrio (Dunn et al., 2004). Nesta fase, os linfócitos e a produção de IFN- γ (Interferon-gama) exercem uma pressão seletiva sobre as células tumorais, que são geneticamente instáveis e que rapidamente expandem as mutações (Dunn et al., 2004). Variantes de células tumorais que tenham adquirido resistência à eliminação, em seguida, entram na fase de escape. Nesta fase, as células tumorais continuam a crescer e expandir-se de forma descontrolada e podem, eventualmente, levar a novos tumores. Uma das características da terceira fase de escape é a imunossupressão promovida pelo tumor (Mittal et al., 2014).

As alterações genéticas que ocorrem durante a carcinogênese fornecem numerosos alvos antigênicos que podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico, no entanto, as células do sistema imune são muitas vezes inibidas por vias que são desreguladas pelo próprio tumor que resulta na supressão de suas funções efetoras (Topalian et al., 2015, Hacohen et al., 2013.). A evasão do sistema imunológico é uma característica bem estabelecida de malignidade e, portanto, aumentar a eficácia do

sistema imunológico tem sido uma área ativa de investigação no combate ao câncer (Hanahan & Weinberg; 2011).

Estas vias inibitórias que levam ao escape imunológico são mediadas principalmente por moléculas da superfície celular denominadas de pontos de controle imune (PCI). Eles representam um grupo de receptores de superfície celular funcionalmente relacionados, mas biologicamente distintos, com funções fisiológicas importantes na manutenção da autotolerância, modulando a resposta imunitária aos agentes patogênicos, e impedindo a autoimunidade (Waterhouse et al., 1995; Nishimura, 1999). Os PCI regulam a resposta imune principalmente através da modulação negativa das células-T, e foi demonstrado maior expressão destas moléculas em câncer de rim, bexiga, estômago, melanoma, pulmão dentre outros (Pardoll et al., 2012).

A descoberta de que as PCIs têm papel importante no mecanismo de escape tumoral abriu o caminho para desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos. Durante a última década, tem havido um crescente interesse em inibidores de PCI no tratamento de várias doenças malignas, e o bloqueio destes pontos por anticorpos, mostraram bons resultados em vários tipos de câncer, incluindo melanoma, câncer do pulmão de células não pequenas, carcinoma de células renais, e CB (Hodi et al., 2010; Powles et al., 2014). A imunoterapia contra câncer agora é considerada um pilar do tratamento do câncer, ao lado da cirurgia, quimioterapia e radioterapia. O Ipilimumab e o nivolumab / pembrolizumab estão entre os primeiros inibidores do PCI (com alvo em CTLA-4 e PD-1, respectivamente) e agora estão se movendo da segunda linha para se tornarem terapias de primeira linha de escolha no câncer de pulmão de células não pequenas avançadas e melanoma (Larkin et al., 2015; Reck et al., 2016).

Um efeito colateral observado com a imunoterapia atual é que com o tempo ocorre indução de resistência através da regulação positiva de PCIs adicionais, além disto, nem todos os pacientes respondem às drogas atuais, destacando a necessidade de novos imunoterápicos (Sharma et al., 2017). Os novos agentes devem visar não apenas o bloqueio de PCIs ou como agonistas de vias imunoestimuladoras, mas também processos imunes inatos mediados por macrófagos e células assassinas naturais (NK), (marcadores resumidos na Figura 2). Portanto, a pesquisa avança no estudo de novos marcadores que atuem nessas vias de escape ao sistema imune para que seja possível o desenvolvimento de novas terapias alvo e critérios de seleção, baseados em marcadores de resposta terapêutica.

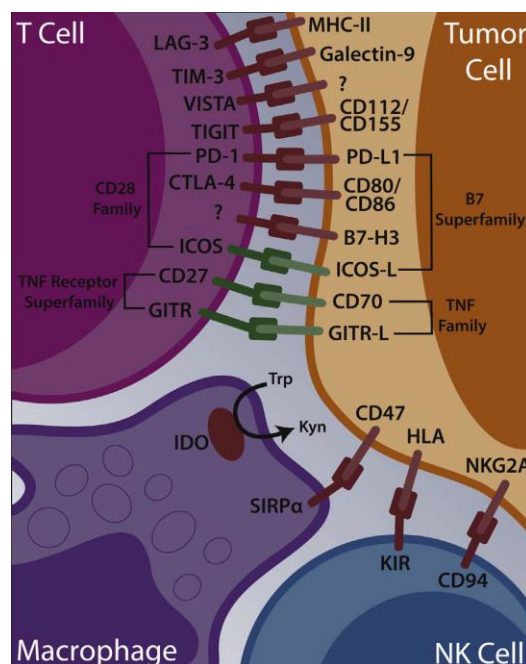


Figura 2. Visão geral de alvos emergentes para imunoterapia de câncer. As interações inibitórias imunes são marcadas em vermelho e as interações co-estimulatórias imunes são marcadas em verde (adaptado de Burugu et al., 2017).

1.10 Ponteciais Biomarcadores

Pesquisas anteriores se concentraram no potencial envolvimento do sistema purinérgico em tumores da bexiga. Os nucleosídeos e nucleotídeos regulam uma variedade de funções biológicas de sinalização de curto e longo prazo (desenvolvimento, regeneração, diferenciação, proliferação e morte celular) (Burnstock, 2002; Stella et al., 2010). Esses eventos são mediados pela ativação dos receptores P1 (para adenosina) ou P2 (para ATP, ADP, UDP e UTP) e são controlados pela ação de ectonucleotidases (Zimmerman, 2001; Burnstock, 2008).

A ATP foi descrita como uma molécula pró-inflamatória que atua como um sinal quimiotático para fagócitos imunes (Stagg & Smyth, 2010; Sävje et al., 2010), enquanto que a adenosina desempenha um papel imunossupressor, reprimindo respostas imunes inatas e adaptativas (Stagg & Smyth, 2010). A participação de expressão de ectonucleotidases alteradas na modulação de células imunes para contribuir para a progressão do câncer foi descrita para gliomas (Bergamin et al., 2012), que possuem um padrão de atividade ATP / ADP / AMPase semelhante ao câncer de bexiga. Este perfil do metabolismo de nucleotídeos pode favorecer o acúmulo de ATP e adenosina extracelular dentro do interstício do tumor, de modo que enquanto o ATP pode induzir morte de células saudáveis, proliferação de tumores e recrutamento de células imunes, a adenosina é responsável pela angiogênese e imunossupressão (Bergamin et al., 2012). Embora a atividade antitumoral de BCG seja devida à estimulação da resposta imune local e aguda e ao recrutamento de granulócitos de neutrófilos polimorfonucleares (Lee et al., 2009), a presença de ATP

e adenosina pode ser importante para criar condições inflamatórias crônicas observadas no microambiente do tumor, o que suprime a resposta imune. Esta hipótese é reforçada pela crescente densidade de células imunes em tecidos da bexiga durante o tratamento com BBN (N-butil-N{4-hidroxibutil}nitrosamina) para indução do CB. Além disso, a presença maciça de macrófagos associados a tumores no estágio clínico tardio do câncer de bexiga (Zhang et al., 2012) e a associação entre linfócitos infiltrantes de tumores e recorrência de câncer de veia muscular não invasiva (Krpina et al., 2012) sugerem ainda o processo inflamatório e a associação do câncer progressão.

1.10a Ectonucleosidades - CD39 e CD73

A sinalização purinérgica é uma via comum de comunicação célula-célula envolvida em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (Agteresch et al., 1999; Hoebertz et al., 2003; Burnstock e Knight, 2004). O ATP, molécula sinalizadora do sistema purinérgico, é um nucleotídeo trifosfatado existente em todas as células e está envolvido na regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular (Burnstock, 1972; 1976). Este nucleotídeo é armazenado em vesículas nas terminações sinápticas e, após despolarização neuronal, é liberado atuando em receptores específicos na membrana pós-sináptica, denominados purinoreceptores (Ralevic e Burnstock, 1998). A liberação de ATP nos terminais pré e pós-sinápticos pode ocorrer como um mecanismo fisiológico ou em resposta a danos celulares, como hipóxia e injúrias (Burnstock, 2008).

Em situações patofisiológicas, a liberação de ATP e a expressão de receptores purinérgicos pelas células são consideravelmente aumentadas (Guido et al., 2008). Como este nucleotídeo não é capaz de atravessar as membranas biológicas por difusão ou transporte ativo, o controle de sua concentração extracelular é realizado pela ação das ectonucleotidases que catalisam sua conversão até adenosina (Bonan et al., 2000; Goding e Howard, 1998; Robson et al., 2006).

Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares atuam como moléculas sinalizadoras envolvidas em uma ampla gama de efeitos biológicos. Estes nucleotídeos extracelulares são degradados por uma cascata de hidrólise constituída por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular, chamadas de ectonucleotidases. As ectonucleotidases estão ancoradas na membrana celular, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular, ou estão presentes na forma solúvel no meio intersticial (Zimmermann, 2011).

O ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1 (CD39), que foi originalmente identificado como um marcador de ativação linfóide expresso em linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, células NK e células endoteliais, está também presente em plaquetas e megacariócitos, participando do metabolismo de nucleotídeos extracelulares (Kansas et al., 1991; Dombrowski et al., 1998; Koziack et al., 1999; Coppola et al., 2005). A atividade enzimática do CD39 desempenha papéis estratégicos em calibrar a duração, a magnitude e a natureza química de sinais purinérgicos que são entregues a células do sistema imune através da conversão de ADP/ATP em AMP para a adenosina, respectivamente (Antonioli et al., 2013).

Há até pouco tempo, quase todo o foco de investigação envolvendo o CD39 foi com relação às suas propriedades tromborreguladoras, à ativação de plaquetas e tecido endotelial (Robson et al., 2005). Apesar do reconhecimento do CD39 como um

marcador de ativação de linfócitos B, pouco se sabe sobre seu papel nas respostas imunitárias humorais ou celulares. Evidências preliminares sugerem que o CD39 pode ter impacto sobre a maturação de anticorpos, levando a compreensão de que a dinâmica da via do CD39 pode modificar conforme o contexto fisiopatológico em que é incorporado (Dwyer et al., 2007).

O CD39 tem sido descrito em células mesenquimais de medula óssea e tem sido responsabilizado por parte da imunomodulação conferida a estas células, mediada pela formação de adenosina (Sattler et al., 2011). O CD39 geralmente age em associação com outras ectonucleosidades, como, por exemplo, o ecto-5'-nucleotidase (CD73). (Antonioli et al., 2013). Dentre seus efeitos está a inibição de linfócitos T (Satter et al., 2011), aumento de interleucina 17A (Sivanathan et al., 2015) e diminuição da infiltração de linfócitos T CD8+ em tumores (Parodi et al., 2013).

Com relação ao CB, estudo com cultura de células RT4 e T24, linhagens representativas de CB grau 1 e grau 3, respectivamente, demonstrou que a expressão de ectonucleosidases é diferenciada entre as linhagens, compondo um fenótipo mais agressivo para as células positivas para CD39 e CD73 (Stella et al., 2010). Além disso, estas moléculas estão envolvidas com resistência tumoral a quimioterápicos (Ujházy et al., 1996) e na promoção de invasão tumoral em outros tipos de câncer (Zhou et al., 2007).

Estudos demonstraram o envolvimento dessas ectonucleosidades na progressão do câncer (Braganhol et al., 2009; Feng et al., 2011). A desfosforilação final de nucleotídeos, a conversão de monofosfatos de nucleosídeos (por exemplo, AMP) para os respectivos nucleósidos (por exemplo, adenosina), é catalisada por CD73. Esta enzima é altamente expressa em uma variedade de tumores sólidos (Spychala. 2000; Wu et al., 2012) e tem sua atividade enzimática e sua função de

proteína de adesão associada à progressão do câncer (Bavaresco et al., 2008; Capellari et al., 2012). Além disso, descobriu-se que o CD73 estava envolvido no crescimento, na maturação, na diferenciação, na adesão, na migração, na invasão, na metástase, na fuga imune e na resistência de droga das células neoplásicas (Wang et al., 2008; Zhang, 2012).

A ação enzimática do CD73 resulta em hidrólise de ATP e geração de adenosina imunossupressora, respectivamente. A inflamação age em todos os estágios da tumorigênese, nos estágios iniciais, cria um microambiente favorável que favorece mutações, instabilidade genômica e modificações epigenéticas e aumento da progressão da angiogênese do câncer, fuga imune e crescimento tumoral (Coussens & Werb, 2002; Grivennikov et al., 2010). Além disso, ATP e adenosina participam de sinalização inflamatória (Bours et al., 2006). Não há relato na literatura de estudo que tenha correlacionado a expressão de CD73 com o marcador de resposta terapêutica no CB.

1.10b Indoleamina 2,3 dioxigenase-1 (IDO1)

A IDO1 é uma enzima produzida pelo tecido embrionário e placenta e induz uma tolerância que protege o embrião contra o sistema imunológico materno, tendo, portanto, uma ação imunossupressora (Munn et al., 1998). Curiosamente, está presente em diversos tipos de tumor, levantando-se a hipótese de que a produção de IDO1 seja uma das “estratégias” para que o tumor fique protegido contra o ataque imunológico (Brandacher et al., 2006; Takao et al., 2007). Devido ao fato da IDO1 exercer seu efeito imunomodulador via degradação do aminoácido triptofano, pesquisadores investem em inibir a atividade enzimática da IDO1 como uma estratégia anti-neoplásica (Friberg et al., 2002; Uyttenhove et al., 2003).

Estudos mais recentes têm demonstrado que o efeito imunomodulador da IDO não se limita apenas à depleção de triptofano, mas também aos metabólitos que são gerados a partir deste aminoácido, mais especificamente os derivados da quinurenina. Terness e colaboradores demonstraram que células dendríticas expressando IDO1 inibem a proliferação de linfócitos T “*in vitro*” e a adição de derivados da quinurerina potencializa este efeito inibitório (Terness et al., 2005). Além de inibir a proliferação, os derivados da quinurenina induzem apoptose em linfócitos T “*in vitro*”, além de suprimirem timócitos alorreativos “*in vivo*” (Fallarino et al., 2002).

São poucos os estudos que relacionam a expressão da IDO1 com o tratamento do CB com BCG. Pesquisadores demonstraram em modelo murino uma ativação prolongada da IDO1 induzida pelo BCG através do sistema imune periférico no cérebro, correlacionando com uma ampla gama de distúrbios somáticos e psiquiátricos o desempenho do metabolismo pela depleção do triptofano causada pela ativação da IDO1 (Capuron & Dantzer, 2003; Wichers & Maes, 2004). Em outro estudo, Moreau e colaboradores inocularam camundongos com BCG (10^7 UFC/camundongo) via intraperitoneal e mensuraram ao longo do tempo a atividade da IDO1 em conjunto com níveis plasmáticos de triptofano e IFN- γ no pulmão e cérebro (Moreau et al., 2008). Os resultados demonstram que a estimulação do sistema imune periférico por BCG conduz à ativação crônica da IDO1 tanto nos pulmões quanto no cérebro (Moreau et al., 2008).

De acordo com a literatura, a IDO1 pode ser considerada, dentre outras variáveis, um indicador preditivo de metástases no CB, dando suporte para uma das principais hipóteses deste trabalho, que a ação imunológica da terapia intravesical com o BCG e a expressão da IDO1 podem estar relacionadas.

Embora a IDO1 esteja sendo estudada em diversos tipos de câncer, apenas dois estudos relataram a expressão da IDO1 em CB. O primeiro, um estudo multivariado de expressão da IDO1 em vários tipos de câncer, identificou através de IHC uma maior expressão de IDO1 em 8 pacientes de um total de 10 com CB, sendo 3 com expressão acima de 50% (Uyttenhove et al., 2003). Outro estudo comparou a expressão proteica de IDO1 em tecidos de CB (n = 84) com tecidos de bexiga normais (n = 22). A expressão positiva de IDO foi encontrada em 48 dos 84 casos tumorais e foi significativamente correlacionada com a piora na classificação histológica, grau histológico e estágio, enquanto a expressão de IDO1 em tecidos normais da bexiga foi expressa em apenas 4 dos 22 (18,2%) casos. Estes resultados indicam que a IDO1 possa estar relacionada com a progressão do CB, podendo ser um fator de pior prognóstico (Yang et al., 2015). O efeito da IDO1 na modulação e na previsão de resposta ao BCG ainda não foi demonstrado, porém *experts* da área tem levantado esta hipótese em revisão recente da literatura, onde a associação do inibidor da IDO1 indoximod (MT) com BCG é sugerida, uma vez que o indoximod tem sido utilizado para outros tipos de câncer como por exemplo o de próstata (apud Kamat et al., 2015).

1.11 Racional para o estudo de imunomoduladores e CB

A demonstração há 4 décadas de que a terapia intravesical com BCG tinha resultado no tratamento do CBNMI representou o indício de que a imunomodulação teria papel no tratamento desta neoplasia. Corroborando essa hipótese, um estudo demonstrou que células NK de pacientes com CB possuíam uma atividade diminuída quando comparadas às células NK de não-portadores de CB (Carballido et al., 1990). Atualmente, temos o pembrolizumab que é um anticorpo direcionado contra o receptor de uma PCI denominada PD1 e que foi liberado em 2017 pela FDA para

tratamento de 2ª linha para o CB metastático (Bellmunt et al., 2017). O melhor entendimento da ação dessas três enzimas (CD39, IDO e CD73) nos aspectos clínicos patológicos, podem elucidar como o imunoescape pode acontecer e como os seus resultados poderiam ser utilizados como prognóstico no CB, podendo serem potenciais alvos terapêuticos. A descoberta de novos marcadores e imunomoduladores pode ampliar o conhecimento sobre a carcinogênese, o arsenal terapêutico e melhorar a tomada de decisões no CB.

2. OBJETIVOS

- Analisar a expressão das moléculas imunomoduladora IDO1, CD39 e CD73 em espécimes humanas de CB, a fim de correlacioná-las com os aspectos clínico-patológicos: Gênero, Idade, Tabagismo, Grau, Tipo de Tumor, Estadio, Tratamento, Recidiva e Progressão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Trata-se de estudo retrospectivo de uma série de pacientes com diagnóstico de CB tratados no Hospital Euryclides Jesus Zerbini. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Euryclides Jesus Zerbini e da UNINOVE sob o nº 49446515.0.0000.5511. O projeto contou com apoio financeiro da FAPESP, projeto regular nº 2016/04105-0.

3.2 Espécimes de CB

Blocos de parafina contendo os espécimes cirúrgicos de cistectomia radical por CBMI e amostras cirúrgicas de RTU por CBNMI foram obtidos no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Euryclides Jesus Zerbini, em conjunto com os dados clínicos e laudos de análise anatomopatológica, que foram obtidas retrospectivamente de prontuário médico. Não houve necessidade de consulta específica para o projeto, bem como convocação de pacientes para aquisição de dados, ou seja, foram utilizados apenas espécimes já colhidos e histórico de prontuário.

Avaliamos retrospectivamente todos os pacientes operados por CB entre 2011 e 2017. O critério de inclusão foi o diagnóstico de CB localizado tratado por cirurgia no período selecionado. Os critérios de exclusão foram indisponibilidade do bloco de parafina, radioterapia neoadjuvante, antecedente de BCG intravesical e ausência de dados clínicos e anatomopatológicos. A partir dos blocos selecionados, foi confeccionada o microarranjo tecidual – TMA (do inglês *Tissue Micro Array*).

3.3 Microarranjo tecidual

O TMA é uma coleção organizada de amostras teciduais dispostas sob a forma de uma matriz, onde cada amostra é suficientemente grande para ser representativa, e convenientemente pequena para permitir o uso não predatório do bloco doador, permitindo utilização racional dos reagentes a serem aplicados na amostra em condições experimentais homogêneas. A principal vantagem do TMA reside na análise simultânea de vários cortes histológicos arranjados em apenas uma lâmina. O primeiro passo da confecção do TMA é a separação dos blocos de parafina contendo o CB e sua respectiva lâmina corada em hematoxilina-eosina. A lâmina é analisada em microscópio óptico para localização e marcação da área representativa do tumor a ser amostrada. Por justaposição da lâmina com o respectivo bloco, marca-se neste último a área de interesse (bloco doador). A seguir, emprega-se aparelho específico que através de agulha coleta-se uma pequena amostra de tecido da área marcada do bloco de parafina doador e o insere no bloco receptor. Em nosso estudo, empregamos um sistema mecanizado de precisão da marca Beecher (mais dados) que coleta cilindros de 1mm de diâmetro e os insere no bloco receptor em intervalos de 0,3 mm (Figura 3).

O procedimento é repetido para cada paciente até que no final do procedimento centenas de espécimes estarão representados no bloco receptor (Figura 4). Cada cilindro amostral é alocado numa posição do bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas, e o conjunto das amostras constituiu o que se denomina de TMA (Moch et al., 1999).



Figura 3. Amostragem e inclusão no bloco receptor

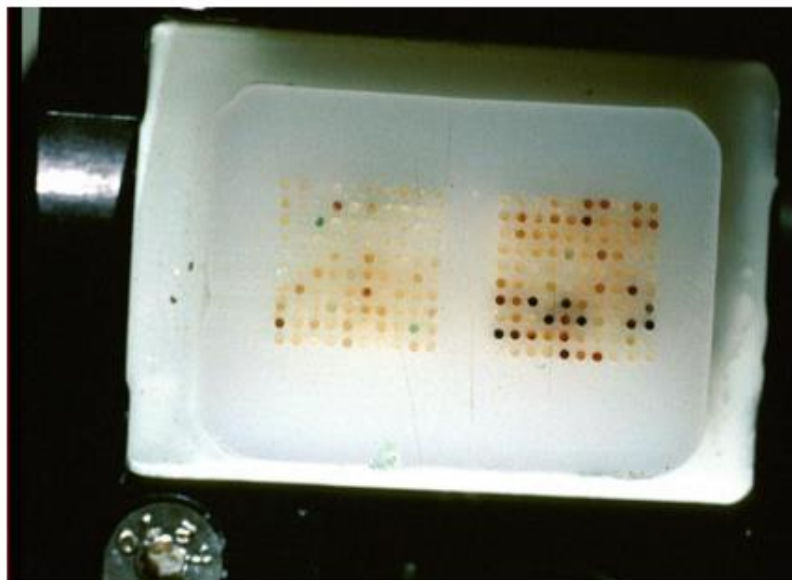


Figura 4. Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado.

Foram selecionados por uma única patologista, Profa. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, 3 regiões da amostra cirurgica. Baseando-se no contexto de diagnóstico a patologista escolheu as regiões na biopsia que melhores representavam o tumor. Foram escolhidas a partir de áreas onde foram encontradas características como regiões planas do epitélio composta por células anaplásicas com um padrão de crescimento desordenado, sem extensão ao lúmen da bexiga ou penetração na membrana basal, regiões com figuras mitóticas abundantes, perda da coesão celular, aumento do número de camadas celulares e aumento do tamanho do núcleo, hipercromático e irregular (Murphy et al., 2000; Cheng et al., 2010; Williamson et al., 2010).

Uma vez pronto, o bloco do TMA é cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 µm. Na sequência, as lâminas são preparadas de acordo com a técnica a ser adotada, seja coloração hematoxilina-eosina, imunohistoquímica ou testes de hibridização. Na figura 5 mostramos as etapas de construção do TMA.

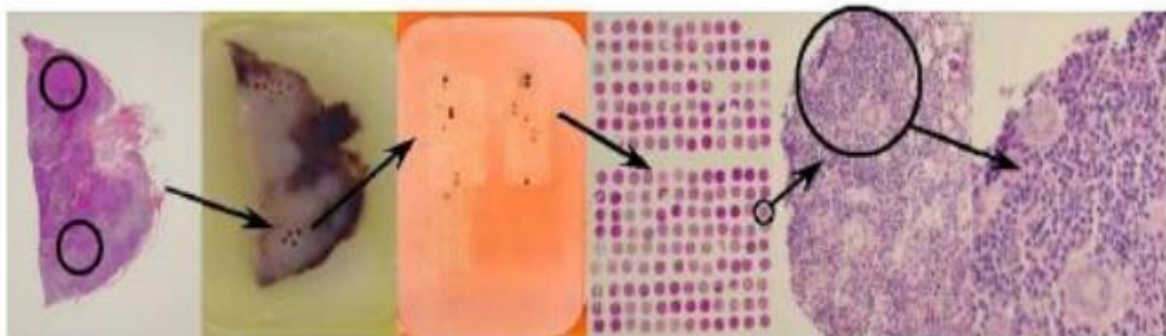


Figura 5. Etapas da confecção do TMA

A realização de reações de IH em lâminas com TMA permite a avaliação da expressão de uma proteína em inúmeros casos em uma única reação, o que confere homogeneidade na avaliação, uma vez que todos os espécimes foram preparados e avaliados em condição idêntica. Outras vantagens do método são a rapidez na

análise de múltiplos casos, economia de reagentes, praticidade e uso não predatório do material evitando o desgaste e com isso permitindo o uso em outras pesquisas. Incluímos no TMA três amostras por paciente, pois é comprovado que a análise IH de pelo menos duas amostras em TMA é comparável ao observado na secção tecidual em 95% das vezes (Camp et al., 2000).

3.4 imunohistoquímica para IDO, CD39 e CD73

Para o processo de desparafinização, as lâminas foram mantidas por 30 minutos em estufa à temperatura de 60°C. Em seguida, as lâminas passaram por baterias de banhos, sendo 3 fases de xilol absoluto por 9 minutos cada, seguidas de 2 banhos em álcool etílico absoluto por 5 minutos e, por fim, 2 banhos em álcool etílico 96% por 5 e 3 minutos, respectivamente. Após a remoção do álcool através de um banho em água destilada por 5 minutos, os tecidos foram submetidos à panela à vapor, em tampão básico EDTA (0,5M, pH 8,0) por 30 minutos, para exposição antigênica. A seguir, as lâminas foram mantidas em solução de bloqueio de peroxidase endógena, composta por 70% de metanol, 20% água destilada e 10% peróxido de hidrogênio 30% (concentração final de peróxido 3%), protegidas da luz, por 30 minutos. Após lavagem em solução salina tamponada (PBS – pH 7,2), as bordas da região contendo as amostras foram margeadas com uso de PapPen (Sigma-Aldrich), a fim de garantir o contato dos reagentes

Foram utilizados os anticorpos primários anti-IDO (ab106134; Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-CD39 (ab178572; Abcam, Cambridge, MA, EUA) e anti-CD73 (ab115289; Abcam, Cambridge, MA, EUA). Após incubação com o anticorpo primário a 4°C durante a noite em câmara úmida, as lâminas foram incubadas com o complexo LSAB HRP (Dako, Carpinteria, USA) para complementação do método

imunohistoquímico. Após revelação com DAB (K3468112, Dako, Carpinteria, EUA), as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris. Em todas as reações, foram realizados controles positivos em tecido sabidamente reativo para cada anticorpo, além do controle realizado na própria lâmina-teste. Os controles negativos foram realizados pela omissão do anticorpo primário e por substituição do mesmo por soro não imune.

3.5 Padronização da IH para IDO, CD39 e CD73

Os anticorpos para imunohistoquímica anti-IDO, anti-CD39 e anti-CD73 foram adquiridos comercialmente e a primeira etapa de padronização foi realizada utilizando-se linfonodo humano como controle positivo. Foi realizada a titulação dos anticorpos, IDO – 1:10, CD39 – 1:500 e CD73 – 1:50. Houve positividade, porém, houve um *background* importante mesmo com as maiores diluições (Figura 6). Contudo, investimos nas diluições e em reagentes para diminuir o *background*.

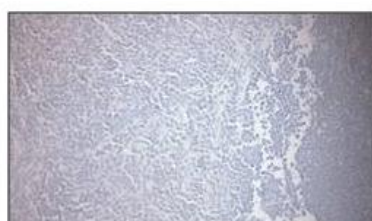


Figura 6. Imunohistoquímica para IDO, CD39 e CD73 em linfonodos humanos com diluição dos anticorpos primários de 1:100. O controle negativo foi feito omitindo-se o anticorpo primário. Nota-se positividade, porém presença de importante *background*.

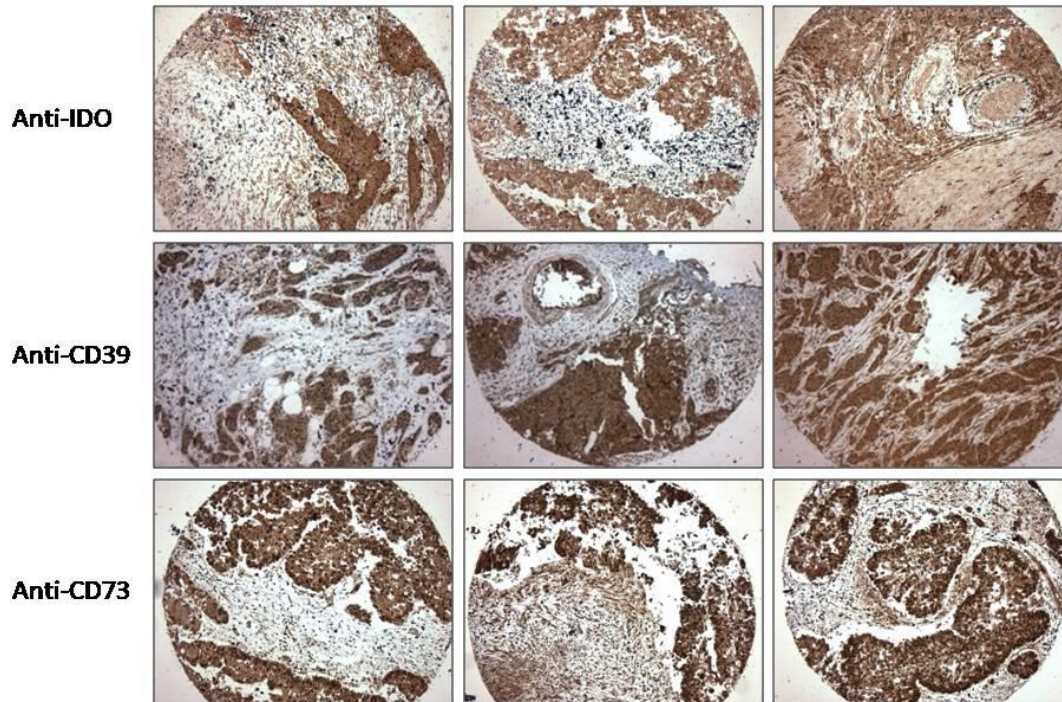


Figura 7. Imunohistoquímica para IDO, CD39 e CD73 em TMA de espécimes de CB de pacientes submetidos à RTU. Três amostras de cada paciente para cada marcador. As lâminas foram contracoloradas com hematoxilina e a positividade é observada em marrom.

Todos os casos foram incluídos em TMA (três amostras de cada paciente) e analisados pela patologista colaboradora do projeto, a Profa. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, quem foi responsável pela seleção das amostras na confecção do TMA e pela análise dos marcadores investigados. A marcação tumoral muito fraca foi classificada como 0 (sem positividade), uma marcação forte e menor do que 50% da área tumoral foi considerada como escore de 1 e uma marcação forte acima de 50% da massa tumoral foi considerada como escore de 2. Foi realizada análise com dois escores finais diferentes, para a escolha do melhor: (1) considerando o maior valor dos três pontos do TMA avaliados pela patologista - por exemplo, um paciente que teve os escores 0, 1 e 2 em suas amostras, foi considerado com escore final de 2; e

(2) a soma dos três escores, por exemplo, o paciente que teve 2, 1 e 2 nas respectivas amostras ficou com um escore final de 5 (Fedchenko & Reifenrath, 2014).

3.6 Análise estatística

O escore (1), conforme comentado acima, foi usado para separar os pacientes em três grupos (sem expressão, baixa expressão e alta expressão). O escore (2), obtido pela soma dos valores dos três pontos do TMA, foi usado para a determinação de uma nota de corte (mediana ou curva ROC) para separar os pacientes em dois grupos (baixa e alta expressão do marcador) (Fedchenko & Reifenrath, 2014). Os testes de qui-quadrado de Pearson, Spearman e Exato de Fisher foram utilizados via programa SPSS versão 22. O odds ratio (OR) entre as expressões de CD39 e CD73 e o tipo tumoral também foi avaliado, no qual foi adotado um intervalo de confiança de 95%. A significância estatística foi considerada a partir do $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção dos pacientes

Nas Tabelas 2 e 3, estão descritos os dados clínicos e histopatológicos de acordo com o tipo de CB. De todos os 165 pacientes com CB, 162 ofereceram amostras viáveis para análises de imunohistoquímica para IDO, CD39 e CD73. As amostras de três pacientes foram deterioradas durante o processo imunohistoquímico. Dos 162 pacientes, todos eram CB uroteliais, 96 eram CBMNI (59,3%) e 66 CBMI (40,7%). Dos 162 pacientes que ofereceram amostras viáveis, 129 eram homens (79,6%) e 33 eram mulheres (20,4%). A maioria era formada por idosos (70,4% > 65 anos) e fumantes (79,5%). Quanto ao grau histológico, 74% dos pacientes eram de alto grau e 26% de baixo grau (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Características clinicopatológicas dos pacientes com CB NMI.

Casos	
Idade (40-92a)	
< 60	20 (22,7 %)
≥ 60	68 (77,3 %)
Gênero	
Feminino	20 (22,7 %)
Masculino	68 (77,3 %)
Tabagismo	
Fumante	65 (73,9 %)
Não Fumante	23 (26,1 %)
Grau Histológico	
G1	41 (46,6 %)
G3	47 (53,4 %)
Estadio	
Ta	68 (77,3 %)
T1	20 (22,7 %)
Grupo de Risco	
Alto Risco	50 (56,8 %)
Risco Intermediário	33 (37,5 %)
Baixo Risco	5 (5,7 %)
Progressão	
Sim	15 (17,0 %)
Não	73 (83,0 %)
Recidiva	
Sim	51 (58,0 %)
Não	37 (42,0 %)
Óbito	
Sim	5 (5,7 %)
Não	83 (94,3 %)

Com relação aos casos CBMI, todos foram submetidos à CR, sendo 63 homens e 14 mulheres (Tabela 2). A Tabela 2 demonstra os dados clinicopatológicos dos pacientes.

Tabela 2. Dados antropométricos dos pacientes com CBMI.

Casos	
Idade (32-86a)	
< 60	11 (14,7%)
≥ 60	66 (85,7%)
Gênero	
Feminino	14 (18,2%)
Masculino	63 (81,8%)
Tabagismo	
Fumante	58 (75,3%)
Não Fumante	8 (10,3%)
Desconhecido	11 (14,2%)
Grau Histológico (RTU)	
G1	1 (1,3%)
G3	76 (98,7%)
Estadio	
Ta	2 (2,6%)
T0	2 (2,6%)
T1	6 (7,8%)
T2	21 (27,3%)
T3	27 (35,1%)
T4	19 (24,7%)
Recidiva	
Sim	24 (31,2%)
Não	53 (68,8%)
Óbito	
Sim	25 (32,5%)
Não	52 (67,5%)

4.2 Expressão de IDO1 em espécimes humanas de CB

A análise da expressão Imunohistoquímica de IDO1 em CBMI e CBNMI, não se correlacionou com gênero, idade e tabagismo. Além disso, não houve diferença com relação ao grau tumoral, recidiva e progressão (Tabela 3). Entretanto, a expressão de IDO1 correlacionou-se com um estadio mais precoce, ou seja, a alta expressão de IDO foi mais frequente em CBNMI (80%) quando comparado à CBMI

(65%) ($p < 0,001$). Corroborando o tipo tumoral, a alta expressão de IDO foi mais frequente em Ta (76%) e em T1 (92%) quando comparados à T2 (81%), T3 (54%) e T4 (63%) ($p < 0,001$). A expressão de IDO1 foi alta nos pacientes submetidos à RTU (81%) em comparação com os pacientes submetidos à CR (67%) ($p < 0,001$) (Tabela 3)

Tabela 3. Correlação entre expressão de IDO1 e aspectos clinicopatológicos em CB.

Parâmetros	N° de Pacientes	IDO1		Valor p
		Baixa Expressão	Alta expressão	
Gênero				
Masculino	129	34 (26 %)	95 (74 %)	0,805
Feminino	33	08 (24 %)	25 (76 %)	
Idade				
≤ 65	48	10 (21 %)	38 (79 %)	0,337
> 65	114	32 (28 %)	82 (84 %)	
Fumante				
Não	31	08 (26 %)	23 (74 %)	0,713
Sim	120	30 (25 %)	90 (75 %)	
Desconhecido	11	04 (36 %)	07 (64 %)	
Grau				
Baixo	42	14 (33 %)	28 (67 %)	0,203
Alto	120	28 (23 %)	92 (77 %)	
Tipo de Tumor				
CBNMI	96	19 (20 %)	77 (80 %)	<0,001
CBMI	66	23 (35 %)	43 (65 %)	
Estadio				
pTa	71	17 (24 %)	54 (76 %)	<0,001
pT1	25	02 (08 %)	23 (92 %)	
pT2	21	04 (19 %)	17 (81 %)	
pT3	26	12 (46 %)	14 (54 %)	
pT4	19	07 (37 %)	12 (63 %)	
Tratamento				
RTU	87	17 (20 %)	70 (81 %)	<0,001
CR	75	25 (33 %)	50 (67 %)	
Recidiva*				
Não	37	10 (27 %)	27 (73 %)	0,130
Sim	50	07 (14 %)	43 (86 %)	
Progressão*				
Não	73	14 (19 %)	59 (81 %)	0,846
Sim	14	03 (21 %)	11 (79 %)	

* Somente pacientes com RTU.

4.3 Expressão de CD39 em espécimes humanas de CB

Ao analisarmos a frequência de casos negativos, de baixa expressão de CD39 e de alta expressão de CD39, não houve diferença quanto ao gênero, idade e tabagismo. Além disso, não houve diferença com relação ao grau tumoral, recidiva e progressão (Tabela 4). Entretanto, a expressão de CD39 correlacionou-se com o tipo de tumor, onde pacientes com CBNMI (52 %) apresentaram maior marcação imunohistoquímica para CD39 em comparação com CBMI (32 %) ($p<0,001$) (Tabela 4). Corroborando este dado, a expressão de CD39 correlacionou-se com o estadio tumoral, onde pacientes com Ta (54%) e T1 (48%) apresentaram alta expressão de CD39 em comparação com pacientes T2 (24%), T3 (39%) e T4 (32%) ($p<0,001$). A expressão de CD39 foi alta nos pacientes submetidos à RTU (53%) em comparação com os pacientes submetidos à CR (33%) ($p<0,001$) (Tabela 3).

Tabela 4. Correlação entre expressão de CD39 e aspectos clinicopatológicos em CB.

Parâmetros	N° de Pacientes	CD39			Valor <i>p</i>
		Negativo	Baixa Expressão	Alta expressão	
Gênero					
Masculino	129	39 (30 %)	34 (26 %)	56 (44 %)	0,538
Feminino	33	07 (21 %)	11 (33 %)	15 (46 %)	
Idade					
≤ 65	48	13 (27 %)	12 (25 %)	23 (48 %)	0,782
> 65	114	33 (29 %)	33 (29 %)	48 (42 %)	
Fumante					
Não	31	06 (19 %)	06 (19 %)	19 (61 %)	0,128
Sim	120	35 (29 %)	35 (29 %)	50 (42 %)	
Desconhecido	11	05 (46 %)	04 (36 %)	02 (18 %)	
Grau					
Baixo	42	8 (19 %)	16 (38 %)	18 (43 %)	0,140
Alto	120	38 (32 %)	29 (24 %)	53 (44 %)	
Tipo de Tumor					
CBNMI	96	11 (11 %)	35 (36 %)	50 (52 %)	<0,001
CBMI	66	35 (53 %)	10 (15 %)	21 (32 %)	
Estadio					
pTa	71	09 (13 %)	24 (34 %)	38 (54 %)	<0,001
pT1	25	02 (08 %)	11 (44 %)	12 (48 %)	
pT2	21	14 (67 %)	02 (10 %)	05 (24 %)	
pT3	26	11 (42 %)	05 (19 %)	10 (39 %)	
pT4	19	10 (53 %)	03 (16 %)	06 (32 %)	
Tratamento					
RTU	87	09 (10 %)	32 (37 %)	46 (53 %)	<0,001
CR	75	37 (49 %)	13 (17 %)	25 (33 %)	
Recidiva*					
Não	37	04 (11 %)	14 (38 %)	19 (51 %)	0,970
Sim	50	05 (10 %)	18 (36 %)	27 (54 %)	
Progressão*					
Não	73	09 (12 %)	28 (38 %)	36 (49 %)	0,210
Sim	14	02 (14 %)	02 (14 %)	10 (71 %)	

* Somente pacientes com RTU.

4.4 Expressão de CD73 em espécimes humanas de CB

Ao analisarmos a frequência de casos negativos, de baixa expressão de CD73 e de alta expressão de CD73, não houve diferença quanto ao gênero, idade e tabagismo. Além disso, não houve diferença com relação ao grau tumoral, estadio e progressão. A recidiva da doença também foi analisada. Conforme demonstrado na Tabela 5, não houve relação entre a expressão de CD73 e a variável recidiva. Diferente do que encontrado nos outros marcadores (IDO e CD39), não foi observada diferença na expressão de CD73 entre CBNMI e CBMI (Tabela 5).

Tabela 5. Análise da correlação da expressão de CD73 e aspectos clinico-patológicos em CB.

Parâmetros	N° de Pacientes	CD73			Valor <i>p</i>
		Negativo	Baixa Expressão	Alta Expressão	
Gênero					
Masculino	129	04 (03 %)	22 (17 %)	103 (80 %)	0,281
Feminino	33	01 (03 %)	02 (06 %)	30 (91 %)	
Idade					
≤ 65	48	00 (00 %)	06 (13 %)	42 (87 %)	0,273
> 65	114	05 (04 %)	18 (16 %)	91 (80 %)	
Fumantes					
Não	31	01 (03 %)	06 (19 %)	24 (78 %)	0,619
Sim	120	04 (03 %)	15 (13 %)	101 (84 %)	
Desconhecido	11	00 (00 %)	03 (27 %)	08 (73 %)	
Grau					
Baixo	42	01 (02 %)	06 (14 %)	35 (34 %)	0,945
Alto	120	04 (03 %)	18 (15 %)	98 (82 %)	
Tumor					
CBNMI	96	03 (03 %)	13 (14 %)	80 (83 %)	0,860
CBMI	66	02 (03 %)	11 (17 %)	53 (80 %)	
Estadio					
pTa	71	03 (04 %)	09 (13 %)	59 (83 %)	0,612
pT1	25	00 (00 %)	04 (16 %)	21 (84 %)	
pT2	21	01 (05 %)	04 (19 %)	16 (76 %)	
pT3	26	00 (00 %)	02 (19 %)	24 (92 %)	
pT4	19	01 (05 %)	05 (26 %)	13 (69 %)	
Tratamento					
RTU	87	02 (02 %)	12 (14 %)	73 (84 %)	0,746
CR	75	03 (04 %)	12 (16 %)	60 (80 %)	
Recidiva*					
Não	37	01 (03 %)	05 (14 %)	31 (84 %)	0,976
Sim	50	01 (02 %)	07 (14 %)	42 (84 %)	
Progressão*					
Não	73	02 (03 %)	09 (12 %)	62 (85 %)	0,564
Sim	14	00 (00 %)	03 (21 %)	11 (79 %)	

* Somente pacientes com RTU.

4.5 Correlação entre IDO, CD39 e CD73

Quando olhamos isoladamente para a expressão do CD73 verificamos que não há associação com nenhum aspecto clinico-patológico, no entanto, quando combinado à expressão de CD39, foi encontrada uma associação significativa com o estágio do tumor. A baixa expressão de CD39 e CD73 foi associada à CB avançada, semelhante à condição de baixa expressão de CD39 e alta expressão de CD73. Em contraste, alta expressão de CD39 e baixa expressão de CD73, bem como a alta expressão de ambas as proteínas, foram associadas à forma CBNMI. Em relação ao

tratamento a alta expressão de ambas apresentou-se no RTU em contraste com a baixa expressão de ambas no CR ($p < 0,001$) (Tabela 6 e 7).

Quando analisamos a associação das expressões de IDO, CD39 e do CD73, observamos uma correlação significativa, demonstrando um potencial para o uso como biomarcadores na avaliação do prognóstico precoce de CB ($p < 0,002$) (Tabela 8).

Tabela 6. Correlação entre a expressão do CD39 e CD73 com os parâmetros clinicopatológicos de 162 pacientes com CB.

Parâmetros	N° de Pacientes	CD39-CD73				Valor <i>p</i>
		CD39 _{baixo}	CD39 _{alto}	CD39 _{baixo}	CD39 _{alto}	
		CD73 _{baixo}	CD73 _{baixo}	CD73 _{alto}	CD73 _{alto}	
Gênero						
Masculino	129	30 (23 %)	28 (22 %)	24 (19 %)	47 (36 %)	0,457
Feminino	33	06 (18 %)	04 (12 %)	07 (21 %)	16 (49 %)	
Idade						
≤ 65	48	09 (19 %)	11 (23 %)	10 (21 %)	18 (38 %)	0,837
> 65	114	27 (24 %)	21 (18 %)	21 (18 %)	45 (40 %)	
Fumantes						
Não	31	06 (19 %)	12 (39 %)	02 (07 %)	11 (36 %)	0,007
Sim	120	25 (21 %)	19 (16 %)	25 (21 %)	51 (43 %)	
Desconhecido	11	05 (46 %)	01 (09 %)	04 (36 %)	01 (09 %)	
Grau						
Baixo	42	08 (19 %)	12 (29 %)	05 (12 %)	17 (41 %)	0,253
Alto	120	28 (23 %)	20 (17 %)	26 (22 %)	46 (38 %)	
Tumor						
CBNMI	96	15 (16 %)	26 (27 %)	08 (08 %)	47 (49 %)	<0,001
CBMI	66	21 (32 %)	06 (09 %)	23 (35 %)	16 (24 %)	
Estadio						
pTa	71	12 (17 %)	22 (31 %)	05 (07 %)	32 (45 %)	<0,001
pT1	25	03 (12 %)	04 (16 %)	03 (12 %)	15 (60 %)	
pT2	21	09 (43 %)	02 (09 %)	05 (24 %)	05 (24 %)	
pT3	26	07 (27 %)	01 (04 %)	10 (39 %)	08 (31 %)	
pT4	19	05 (26 %)	03 (16 %)	08 (42 %)	03 (16 %)	
Tratamento						
RTU	87	12 (14 %)	26 (30 %)	06 (07 %)	43 (49 %)	<0,001
CR	75	24 (32 %)	06 (08 %)	25 (33 %)	20 (27 %)	
Recidiva*						
Não	37	08 (22 %)	09 (24 %)	02 (05 %)	18 (49 %)	0,291
Sim	50	04 (08 %)	17 (34 %)	04 (08 %)	25 (50 %)	
Progressão*						
Não	73	11 (15 %)	21 (29 %)	05 (07 %)	36 (49 %)	0,867
Sim	14	01 (07 %)	05 (36 %)	01 (07 %)	07 (50 %)	

* Somente pacientes com RTU.

Tabela 7. Correlação entre a expressão do CD39 e CD73 com os parâmetros clínico-patológicos de predição do tipo tumoral de 162 pacientes com CB.

	Odds Ratios	95 %	Valor P	Predição
CD39_{Alto}	0,158	0,079 – 0,315	<0,001	CBNMI
CD73_{Alto}	1,077	0,570 – 2,034	0,872	Nenhum
CD39_{Baixo}CD73_{Baixo}	2,520	1,183 – 5,368	0,013	CBMI
CD39_{Alto}CD73_{Baixo}	0,269	0,104 – 0,698	0,005	CBNMI
CD39_{Baixo}CD73_{Alto}	5,884	2,432 – 14,232	<0,001	CBMI
CD39_{Alto}CD73_{Alto}	0,334	0,167 – 0,666	0,002	CBNMI

Tabela 8. Correlação por Spearman entre IDO, CD39 e CD73.

			IDO	CD39	CD73
Rô de Spearman	IDO	Coeficiente de Correlação	1,000	0,384**	0,194*
		Sig, (2 extremidades)	,	0,000	0,0136
		N	162	162	162
	CD39	Coeficiente de Correlação	0,384**	1,000	0,298**
		Sig, (2 extremidades)	0,002	,	0,000
		N	162	162	162
CD73	Coeficiente de Correlação	0,194*	0,298**	1,000	
	Sig, (2 extremidades)	0,000	0,000	,	
	N	162	162	162	

** A correlação é significativa no nível 0,01 (bicaudal).

* A correlação é significativa no nível 0,05 (bicaudal).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho tem forte relação com a imunoterapia em câncer, cuja qual é um tema de extrema relevância na atualidade. Uma parte de nosso trabalho envolve a IDO, uma molécula que passou a ser reconhecida por suas propriedades imunomoduladoras a partir de 1998, quando Munn e colaboradores descreveram sua importância em proteger o embrião semialogênico contra o sistema imune materno (Munn et al., 1998). À medida que a IDO foi sendo descrita em tipos diferentes de câncer, suas propriedades imunomoduladoras colocaram-na em um dos mais importantes *hallmarks* do câncer. Isso explica a mobilização da comunidade científica na busca de seu papel em diferentes tipos de câncer e na possibilidade de considerá-la um alvo terapêutico.

Embora a atividade antitumoral do BCG seja devido à estimulação da resposta imune local e aguda e o recrutamento de granulócitos polimorfonucleares, a presença do ATP e da adenosina podem ser importantes para criar condições inflamatórias crônicas observadas no microambiente tumoral, que suprimem a resposta imune, estes dados corroboram de certa forma aos resultados já descritos no trabalho de Antonioli (Antonioli et al., 2013). Neste contexto, identificamos a necessidade de estudar a IDO, o CD39 e o CD73 no CB, mais especificamente caracterizando o perfil de sua expressão em espécimes humanas.

Neste estudo observamos que a expressão de IDO foi intensa na maioria dos casos CBNMI e nos estágios iniciais. É possível que a indiferenciação das células tenha relação com o perfil concêntrico de instalação tumoral e a IDO tenha participação nesse processo. Nossa observação da alta expressão de IDO no CBNMI parece um tanto paradoxal. Há dados cumulativos sugerindo que a ativação de IDO

representa um mecanismo pelo qual as células tumorais podem escapar do sistema imunológico (Katz et al., 2008; Lob et al., 2009). A superexpressão de IDO está associada a um mau prognóstico em diferentes tipos de câncer, como câncer de ovário (Nelson, 2009), câncer de pulmão de pequenas células (Smith et al., 2012) e câncer colorretal (Ferdinande et al., 2012). No entanto, outros estudos demonstraram resultados, onde a expressão de IDO correlacionou-se com a sobrevida prolongada no carcinoma hepatocelular e no carcinoma de células renais (Lu et al., 2012), sugerindo que a IDO também pode promover e prevenir o crescimento do tumor.

A influência da expressão de IDO em estágios iniciais e no CBNMI podem ser devido aos efeitos tóxicos de metabólitos de triptofano induzidos por IDO, que são capazes de induzir apoptose em linfócitos e também em células tumorais (Lu et al., 2012; Matino et al., 2015). Além disso, estudos anteriores sugeriram que o INF- γ tem um maior efeito inibitório nas células cancerígenas quando o tratamento com o mesmo, induz a expressão de IDO (Lu et al., 2012). Outro exemplo foi encontrado no estudo de Zhai e colaboradores onde a expressão de IDO se correlacionou com a produção de IFN- γ e melhor sobrevida no carcinoma hepatocelular (Zhai et al., 2015). Em um outro estudo, Godin-Ethier e colaboradores, demonstraram que o mRNA do IFN- γ foi superexpresso em câncer medular de mama, e se correlacionou fortemente com a expressão de mRNA da IDO (Godin-Ethier et al., 2009), propondo assim que o IFN- γ pode inibir o crescimento e induzir a expressão de IDO em alguns cânceres.

Em alguns tumores, a IDO é constitutivamente expressa pelas próprias células tumorais como um mecanismo de escape imunológico ou em alguns casos, podem conferir alguma vantagem de sobrevivência não imunológica aos tumores (Fuldord et al., 2007; Desmedt et al., 2008). Em um número pequeno de tipos de tumores, a

expressão de IDO parece ser induzida ou "reativa" - isto é, associada a um aumento da infiltração e inflamação por células T (Munn et al., 1999; Yan et al., 2019). Nessa situação, a regulação positiva de IDO pode ser apropriada para fortalecer a resposta espontânea antitumoral e, portanto, estar associado a prognóstico mais favorável (Mellor et al., 2005; Yu et al., 2014). Sendo assim, baseados na literatura, nossos resultados relativos a expressão da IDO podem estar associados ao balanço na quantidade de células inflamatórias (tamanho do infiltrado inflamatório), sendo maior no CBNMI do que no CBMI.

Algumas limitações em relação aos dados analisados da expressão das enzimas quanto a progressão da doença (tabelas 5, 6 e 7), foram calculados somente em cima do número de pacientes que pudemos acompanhar o *follow up* após passarem pela RTU, sendo que não obtivemos valores significativos para considerá-los. Muitos estudos sobre a expressão de IDO em cânceres humanos, por exemplo, revelaram que pacientes com alta expressão de IDO diminuíram a sobrevida livre de doença (Astigiano et al., 2005; Takao et al., 2007). Outro estudo demonstrou que a expressão de IDO avaliada por imunohistoquímica e a atividade enzimática foram inversamente correlacionadas com sobrevida livre da doença em câncer endometrial e melanoma maligno (Ino et al., 2006; Brody et al., 2009). Yang e colaboradores demonstraram em um estudo com 84 pacientes que a expressão de IDO positiva teve um resultado clínico ruim, no entanto, relataram algumas limitações em seu estudo também. Primeiro, uma análise multivariada foi necessária para explorar se IDO era um fator prognóstico independente para sobrevida livre da doença e em segundo lugar, o nível de proteção de IDO em CB não foi detectado por western blot (Yang et al., 2015).

Outra parte do nosso trabalho envolve a pesquisa das ectonucleotidases CD39 e a CD73 que foram observadas na participação de complexos no processo de immunoescape tumoral, através da inibição da ativação, expansão clonal e *homing* de células T específicas (em particular, os auxiliares e os T citotóxicos), prejudicando a morte de células tumorais por linfócitos T efetores, ditando, através da geração pericelular de adenosina, um componente substancial na capacidade supressora das células Tregs. A expressão e a atividade de CD39 e CD73 em sangue e em vários tumores sólidos, sugerindo papéis importantes na promoção do crescimento tumoral e infiltração (Antonioli et al., 2013). Além disso, o ATP e a adenosina participam na sinalização inflamatória (Bours et al., 2006). O ATP tem sido descrito como uma molécula pró-inflamatória na qualidade de um sinal quimiotático para células fagocitárias imunes, enquanto a adenosina tem um papel imunossupressor de respostas imunes inatas e adaptativas (Stagg & Smyth, 2010). A participação da expressão de ectonucleotidases alteradas na modulação de células imunes para contribuir para o progresso do câncer têm sido descritas para gliomas (Bergamin et al., 2012), os quais possuem um padrão semelhante na atividade ATP / ADP / AMPase no câncer de bexiga. Este perfil do metabolismo de nucleotídeos pode favorecer o ATP extracelular e a acumulação de adenosina no interstício do tumor, portanto, enquanto o ATP poderia induzir a morte de células saudáveis, a proliferação do tumor, e recrutamento de células do sistema imunológico, a adenosina é a responsável pela angiogênese e imunossupressão (Bergamin et al., 2012).

Estudo com células mesenquimais multipotentes demonstrou que o sistema de ectonucleases CD39 / CD79 está presente nestas células, as quais expressamIDO constitutivamente e são fortemente estimuladas na presença de INF- γ (Sattler et al., 2011). Trabalhando com microarray, Marteau e colaboradores demonstraram que a

IDO é superexpressa em células dendríticas estimuladas por ATP extracelular e em estudo subsequente demonstraram que a adenosina age estimulando estas células através de receptor purinérgico A (Marteau et al., 2005; Ben et al., 2008). Este estudo demonstra que é possível que haja uma ligação entre estas moléculas, no entanto, no CB esta ligação entre IDO e CD39 não foi ainda demonstrada.

Em relação à bexiga normal, as ectonucleotidases desempenham papel nas contrações do detrusor mediadas pelos nervos e na exocitose da camada de células guarda-chuva (células superficiais), controlando as concentrações de ATP / adenosina no espaço extracelular (Wang et al., 2005; McCarthy et al., 2019). É possível que CD39 e CD73 estejam envolvidos em outros processos fisiológicos do trato urinário inferior, mas isso permanece incerto.

A expressão de CD39 e CD73 foi identificada em vários tumores humanos, incluindo câncer de rim, câncer de ovário, câncer de testículo, câncer de pâncreas, câncer de pulmão, câncer de tireóide, linfoma, sarcoma e leucemia (Pulte et al., 2011; Häusler et al., 2011; Bastid et al., 2015; Hayes et al., 2015). Em relação à CB, o papel do CD39 / CD73 não é claro, embora a sinalização purinérgica tenha sido descrita em tumores da bexiga (Shabbir et al., 2007). Stella e colaboradores, demonstraram que o perfil da atividade da ectonucleotidase se correlaciona com malignidade em CB, demonstrando um padrão distinto no metabolismo de nucleotídeos entre os tumores CBNMI e CBMI. Trabalhando com linhagem de células CB humanas, demonstraram que as células CB com baixo fenótipo de malignidade exibiram um alto nível de hidrólise de tri e difosfonucleosídeos devido à alta expressão da NTPDase 3. Em contraste, as células com um fenótipo de alta malignidade exibiram uma redução robusta da NTPDase 3 expressão (Stella et al., 2010). Alguns anos depois, o mesmo

grupo trabalhou com um modelo de tumor de bexiga induzido por produtos químicos, demonstrando que a imunocoloração para NTPDase é progressivamente perdida durante a progressão da doença, em contraste com a expressão de CD73 que aumentou ao longo do tempo (Rockenbach, 2014).

No contexto fisiopatológico, CD39 e CD73 têm sido encontrados em neoplasias levantando a hipótese de seu envolvimento na tumorigênese (Bastid et al., 2015; Wettstein et al., 2015). No presente estudo, mostramos que a suprarregulação de CD39 está associada à CBNMI, enquanto a suprarregulação de CD73 com baixa expressão de CD39 está associada à forma CBMI, levantando a hipótese de que os nucleotídeos / equilíbrio de adenosina pode ser eficaz na determinação do fenótipo invasivo em células CB.

Como dito anteriormente, a relação da expressão do CD39 no CB não foi estudada no CB até o momento. Por outro lado, existem algumas informações sobre o CD73 em tumores uroteliais. Wettstein e colaboradores mostraram que o CD73 previu um prognóstico favorável em pacientes com CBNMI. Em seu estudo, os casos de alta expressão de CD73 foram mais frequentes nos estágios pT1 e pTa, embora nenhuma associação com a expressão de CD39 tenha sido feita (Wettstein et al., 2015). Mais recentemente, Koivisto e colaboradores demonstraram resultados semelhantes, expandindo a análise para CBMI, onde a alta expressão de CD73 pelas células neoplásicas foi mais frequente no CBNMI do que no CBMI (Koivisto et al., 2019), fenômeno não encontrado em nosso estudo. Em nosso estudo, a expressão de CD73 isolado não foi suficiente para predizer o estágio de CB (Tabela 7), sugerindo o uso da expressão de CD39 isolado ou balanço de expressão de CD39 / CD73 como uma estratégia útil para acessar o status invasivo do CB. Em outros tumores, o CD73

foi associado ao pior prognóstico. A superexpressão de CD73 promove invasão, migração, adesão e metástase de células de câncer de mama humano e em melanomas (Stagg et al., 2010; Stagg et al., 2011).

Embora haja pouca informação sobre o CD39 no CB, ele foi amplamente descrito em outros tipos de tumor. O CD39 é superexpresso no câncer de pâncreas, correlacionando-se positivamente com a sobrevida em longo prazo após o tratamento cirúrgico (Kunzli et al., 2007). No adenocarcinoma retal, embora o CD39 tenha sido fortemente expresso em células malignas estando associado ao estágio inicial do tumor, sua associação com o CD73 ofereceu uma melhor estratégia para prever o prognóstico (Zhang et al., 2015). A análise combinada exibindo baixa expressão de CD39 e alta expressão de CD73 em ambos os níveis de proteína e mRNA foi associada com invasão e metástase levando a um desfecho clínico desfavorável (Zhang et al., 2015), da mesma forma que propusemos aqui para CB.

Diante da análise dos resultados, proporíamos que a superexpressão de CD39 poderia aumentar a concentração de adenosina no espaço extracelular, o que poderia induzir imunossupressão local e conseqüentemente progressão tumoral. No entanto, os casos de CD39baixa / CD73baixa e CD39alta / CD73alta foram mais frequentes no CBMI e CBNMI, respectivamente (Tabela 8). Na verdade, o acesso ao status de ATP / adenosina seria fundamental para a compreensão desse fenômeno controverso. Uma limitação importante de nosso estudo é a falta de abordagens técnicas para determinar ATP / adenosina em amostras tumorais de pacientes. A análise de imunocoloração para CD39 e CD73 é uma forma simplista de acessar o complexo sistema de nucleotídeos / adenosina. Os efeitos finais serão determinados por vários fatores. Primeiro, a quantidade de ATP que se move para o espaço

extracelular, seja por lesão celular ou por transporte de canal. O microambiente tumoral pode apresentar uma concentração de ATP 1000 vezes maior no espaço intersticial em comparação com os tecidos normais (Di Virgilio et al., 2017). Segundo, além de CD39 e CD73, tanto os nucleotídeos quanto os nucleosídeos podem ser removidos do espaço extracelular por várias outras famílias de ectoenzimas. Terceiro, o ATP e a adenosina exercem efeitos ligando-se aos receptores purinérgicos - receptores P1, com adenosina como principal ligante, e receptores P2, com ATP e ADT como principais ligantes; Os receptores P2 são subdivididos em sete P2X ionotrópicos e oito subtipos P2Y metabotrópicos (Ravelic et al., 1998; White; Burnstock, 1998). Portanto, os papéis do equilíbrio ATP / adenosina no CB dependerão de vários níveis de expressão e padrões de coexpressão.

A expressão alterada de CD39 e CD73 aqui apresentada apoia a ideia de que essas ectonucleotidases estão envolvidas na tumorigênese da bexiga. Nossos resultados sugerem que as células uroteliais malignas do CB expressam fortemente CD39 e CD73; no entanto, a alta expressão de CD39 em células tumorais está correlacionada com o estágio inicial do CB. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel efetivo do CD39 e do CD73 no estabelecimento do fenótipo invasivo em células CB.

Embora estudos adicionais sejam necessários para determinar se as alterações na expressão ectonucleotidases são a causa ou a consequência da transformação maligna do urotélio, propomos, baseados na literatura e na corroboração de nossos resultados, que aIDO, o CD39 e o CD37 possuem potencial para biomarcadores alvos para terapia farmacológica.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que:

- 1) A expressão de IDO1 correlacionou-se com um estadiamento mais precoce, ou seja, a alta expressão de IDO foi mais frequente em CBNMI quando comparado à CBMI;
- 2) A expressão de CD39 correlacionou-se com o tipo de tumor e estadiamento precoce da doença, onde pacientes com CBNMI apresentaram maior marcação imunohistoquímica para CD39 em comparação com CBMI, podendo ser um biomarcador complementar;
- 3) As expressões de CD39 e IDO foram altas nos pacientes submetidos à RTU em comparação com os pacientes submetidos à CR;
- 4) A expressão do CD73 isolada não foi associada a características clínico-patológicas;
- 5) Quando associados, o CD39 (baixa expressão) e o CD73 (alta expressão) correlacionaram-se com CBMI, propondo um estabelecimento do fenótipo invasivo em células CB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs*. 1999; 58: 211-232.
- Antonoli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation, *Trends Mol Med*, 2013; 19(6):355-67.
- Apolo AB, Grossman HB, Bajorin D, et al. Practical use of perioperative chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: summary of session at the Society of Urologic Oncology annual meeting, *Urol Oncol*, 2012; 30:772–80.
- Astigiano S, Morandi B, Costa R, Mastracci L, D'Agostino A, Ratto GB, Melioli G, Frumento G. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated immune escape in human non small cell lung cancer. *Neoplasia*. 2005;7:390–396.
- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, et al. EAU guidelines on non muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, *Eur Urol*, 2013; 64(4):639-53.
- Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity, *Cancer Immunol Res* 2015;3:254–65.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, et al. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation, *Mol Cell Biochem*, 2008; 319(1-2):61-8.
- Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma, *N Engl J Med* 2017; 376:1015-1026.
- Ben Addi A, Lefort A, Hua X, Libert F, Communi D, Ledent C, Macours P, Tilley SL, Boeynaems JM, Robaye B. Modulation of murine dendritic cell function by adenine nucleotides and adenosine: involvement of the A(2B) receptor, *Eur J Immunol*, 2008 Jun;38(6):1610-20.
- Bergamin LS, Braganhol E, Zanin RF, Edelweiss MI, Battastini AM. Ectonucleotidases in tumor cells and tumor associated immune cells: an overview, *J Biomed Biotechnol* 2012; 959848.
- Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol*. 2003;170:964-9.
- Bonan CD, Amaral OB, Rockenbach IC, Walz R, Battastini AM, Izquierdo I, et al. Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res*. 2000; 25: 775-779.
- Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and in inflammation, *Pharmacol Ther*, 2006; 112:358–404.
- Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppel D, Meurer L, Edelweiss MI, et al. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth, *Cancer Sci*, 2009; 100:1434–1442.

- Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells, *Clin Cancer Res* 2006; 12, 1144–1151.
- Brandau S, Riemensberger J, Jacobsen M, Kemp D, Zhao W, Zhao X, Jocham D, Ratliff TL, Böhle A. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy, *Int J Cancer*, 2001 Jun; 92(5):697-702.
- Brennan, P, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case control studies, *Int J Cancer*, 2000, 86: 289.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK and Wittekind C. UICC TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition, Wiley-Blackwell, 2016.
- Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, Emmons RV, Witkiewicz AK. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle*. 2009;8:1930–1934.
- Burger, M, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer, *Eur Urol*, 2013, 63: 234.
- Burnstock G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling, *Clin Med* 2002; 2:45–53.
- Burnstock G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4: 47-52.
- Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol*. 1976; 62: 491-503.
- Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7: 575-590.
- Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972; 24: 509-581.
- Burugu S, Dancsok AR, Nielsen TO. Emerging targets in cancer immunotherapy, *Semin Cancer Biol*, 2017; S1044-579X (17)30182-7.
- Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma, *Lab Invest*, 2000; 80(12):1943-9.
- Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, Braganhol E, Battastini AM. Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion, *Mol Cell Biochem* 2012; 359:315–322.
- Capuron L, Dantzer R. Cytokines and depression, *Brain Behav Immun* 2003; 17(Suppl1):S119–24.
- Carballido J, Alvarez-Mon M, Solovera OJ, Menéndez-Ondina L, Durántez A. Clinical significance of natural killer activity in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1990; 143: 29-33.
- Chavan, S, et al. International variations in bladder cancer incidence and mortality, *Eur Urol*, 2014; 66: 59.

Cheng L, Davidson DD, Maclennan GT, et al. The origins of urothelial carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 865-880.

Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy, *Cancer Cell*, 2014; 25: 152.

Cina SJ, Epstein JI, Endrizzi JM, Harmon WJ, Seay TM, Schoenberg MP. Correlation of cystoscopic impression with histologic diagnosis of biopsy specimens of the bladder, *Hum Pathol* 2001; 32(6):630-7.

Coon JS, Weinstein RS, Summers JL. Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1982; 77: 692-699.

Coppola A, Coppola L, dalla Mora L, Limongelli FM, Grassia A, Mastrolorenzo L et al. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression, *J Appl Physiol* 2005; 98:1414-19.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer, *Nature*, 2002; 420:860–867.

Dangles V, Validire P, Wertheimer M, Richon S, Bovin C, Zeliszewski D, Vallancien G, Bellet D. Impact of human bladder cancer cell architecture on autologous T-lymphocyte activation. *Int J Cancer* 2002; 98: 51-56.

Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart M, Sotiriou C. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5158–65.

Di Stasi SM, Giannantoni A, Giurioli A, et al. Sequential BCG and electromotive mitomycin versus BCG alone for high-risk superficial bladder cancer: A randomised controlled trial, *Lancet Oncol*, 2006; 7:43–51.

Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*. 2017;36(3):293–303.

Dombrowski K, Ke Y, Brewer KA, Kapp JA. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function, *Immunol Rev* 1998; 161:111-18.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting, *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 329-360.

Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses, *Purinergic Signalling* 2007; vol, 3, no, 1-2, pp, 171–180.

Epstein JI. The new World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) classification for TA, T1 bladder tumors: is it an improvement? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003; 47:83-9.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism, *Cell Death Differ* 2002; 9:1069-77.

Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol*. 2014; 9:221.

- Feng L, Sun X, Csizmadia E, Han L, Bian S, Murakami T, Wang X, Robson SC, Wu Y. Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate, *Neoplasia* 2011; 13:206–216.
- Ferdinande, L. et al. Clinico pathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase1 expression in colo rectal cancer. *Br. J.Cancer* 2012;141–147
- Ferlay, J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012, *Eur J Cancer* 2013; 49: 1374.
- Fleischmann JD, Toossi Z, Ellner JJ, Wentworth DB, Ratliff TL, Imbembo AL. Urinary interleukins in patients receiving intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer, *Cancer* 1989; 64:1447–54.
- Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor AL, Munn DH, Antonia SJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection, *Int J Cancer* 2002; 101:151-155.
- Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, Easton D, Lakhani SR. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res* 2007;9:R4.
- Gakis G, et al. Members of the EAU Guidelines Panel on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer, Guidelines on primary urethral carcinoma, Edn, presented at the EAU Annual Congress Munich 2016, ISBN 978-90-79754-98-4.
- Gandini, S, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis, *Int J Cancer*, 2008; 122: 155.
- Gao YF, Peng RQ, Li J, Ding Y, Zhang X, Wu XJ, Pan ZZ, Wan DS, Zeng YX, Zhang XS. The paradoxical patterns of expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in colon cancer. *J Transl Med.* 2009 Aug 20;7:71.
- Godin-Ethier J, Pelletier S, Hanafi LA, Gannon PO, Forget MA, Routy JP, Boulassel MR, Krzemien U, Tanguay S, Lattouf JB, Arbour N, Lapointe R. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *J Immunol* 2009;183:7752–60.
- Goding JW, Howard MC. Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol Rev.* 1998; 161: 5-10.
- Graham SD. Immunology of the bladder. *Urol Clin North Am* 1992;19: 541-548.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer, *Cell*, 2010; 140:883–899.
- Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, et al. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer, *N Engl J Med*, 2003; 349:859–66.
- Guido B, Keiichi E, Yan W, Lindsay M, Yara B, Xiaofeng S, Robson S. The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism. *Front Biosci.* 2008; 13: 2588-2603.
- Hacohen N, Fritsch EF, Carter TA, Lander ES, Wu CJ. Getting personal with neoantigen-based therapeutic cancer vaccines, *Cancer immunology research*, 2013; 1:11–5.

Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 2011; 144(5):646–674.

Hart IR, Birch M, Marshall JF. Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 115-128.

Häusler SFM, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, et al. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OVCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity, *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:1405–18.

Hayes GM, Cairns B, Levashova Z, et al. CD39 is a promising therapeutic antibody target for the treatment of soft tissue sarcoma, *Am J Transl Res* 2015;7:1181–8.

Hirohashi S, Clausen H, Yamada T, Shimosato Y, Hakomori S. Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -81 expressed in cancer of blood group O or B individuals: its identification as Tn antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7039-7043.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma, *The New England journal of medicine*, 2010; 363:711–23.

Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24: 290-297.

Hudolin T, Mengus C, Coulot J, Kastelan Z, El-Saleh A, Spagnoli GC. Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene Is a Feature of Poorly Differentiated Non-muscle-invasive Urothelial Cell Bladder Carcinomas, *Anticancer Res*, 2017; 37(3):1375-1380.

Ikeda N, Toida I, Iwasaki A, Kawai K, Akaza H. Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette–Guerin (BCG): a role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol* 2002; 9: 29–35.

INCA, 2020, Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K, Takahashi N, Terauchi M, Nawa A, Nomura S. Indoleamine 2, 3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer*. 2006;95:1555–1561.

Jackson AM, Alexandroff AB, Kelly RW, Skibinska A, Esuvaranathan K, Prescott S, et al. Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol*. 1995;99:369-75.

Jacquemier, J., Bertucci, F., Finetti, P., Esterni, B., Charafe-Jauffret, E., Thibult, M.-L., Houvenaeghel, G., Van den Eynde, B., Birnbaum, D., Olive, D. and Xerri, L. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in the tumour is associated with medullary features and favourable outcome in basal-like breast carcinoma. *Int. J. Cancer* 2012; 130: 96-104.

Janaszek-Seydlitz W, Prygiel M, Bucholc B, Wiatrzyk A, Czajka U, Górska P, Soliwoda U. Effect of different Bacillus Calmette-Guerin substrains on growth inhibition of T24 bladder

cancer cells and cytokines secretion by BCG activated peripheral blood mononuclear cells of PBMCs, *Adv Clin Exp Med*, 2014; 23(6):877-84.

Kamat AM, Flaig TW, Grossman HB, Konety B, Lamm D, O'Donnell MA, Uchio E, Efstathiou JA, Taylor JA. Expert consensus document: Consensus statement on best practice management regarding the use of intravesical immunotherapy with BCG for bladder cancer, *Nat Rev Urol*, 2015; 12(4):225-35.

Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes, *J Immunol* 1991; 16:2235-44.

Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* 2008; 222: 206–21.

Kingshuk RC, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG. A Robust Automated Measure of Average Antibody Staining in Immunohistochemistry Images, *J Histochem Cytochem*, 2010; 58(2): 95–107.

Koivisto MK, Tervahartiala M, Kenessey I, Jalkanen S, Boström PJ, Salmi M. Cell-type-specific CD73 expression is an independent prognostic factor in bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2019;40(1):84–92.

Korthals HR, Van Vinninghe AL, Neumann HAM. The presence of β 2 microglobulin on the membrane of the keratinocyte in premalignant skin disorders. *Br J Dermatol* 1981; 104: 515-519.

Koziak K, Sévigny J, Robson SC, Siegel JB, Kacsmarek E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes, *ThrombHaemost* 1999; 82:1538-44.

Kriegmair M, Zaak D, Knuechel R, Baumgartner R, Hofstetter A. Photodynamic cystoscopy for detection of bladder tumors, *Semin Laparosc Surg*, 1999; 6(2):100-3.

Krpina K, Babarović E, Dorđević G, Fuckar Z, Jonjić N. The association between the recurrence of solitary non-muscle invasive bladder cancer and tumor infiltrating lymphocytes, *Croat Med J*, 2012; 53:598–604.

Kunzli BM, Berberat PO, Giese T, et al. Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G223–30.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma, *N, Engl, J, Med, Massachusetts* 2015; 23–34.

Lattime EC, Gomella LG, McCue PA. Murine bladder carcinoma cells present antigen to BCG-specific CD4+ T-cells. *Cancer Res* 1992; 52: 4286–90.

Lee CF, Chang SY, Hsieh DS, Yu DS. Immunotherapy for bladder cancer using recombinant bacillus Calmette-Guerin DNA vaccines and interleukin-12 DNA vaccine. *J Urol*. 2004;171:1343-7.

Lee SJ, Cho YH, Park K, Kim EJ, Kang BS, JungKH, Kim CH, Kim WJ, Moon SK. Inhibitory effects of the aqueous extract of *Magnolia officinalis* on the responses of human urinary bladder cancer 5637cells in vitro and mouse urinary bladder tumors induced by N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in vivo, *Phytother Res*, 2009; 23:20–27.

Lipponen PK. Overexpression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value, *Int J Cancer* 1993; 53: 365-70.

Lob S, Konigsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 445–52.

Lob S, Konigsrainer A, Zieker D, Brucher BL, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 153–7.

Luo Y, Knudson MJ. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells, *Clin Dev Immunol*, 2010; 2010:357591.

MacLennan, G,T, et al. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms, *Eur Urol*, 2007; 51: 889.

Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, et al. Radical cystectomy for bladder cancer today – a homogeneous series without neoadjuvant therapy, *J Clin Oncol*, 2003; 21(4):690–696.

Maksymowych WP, Kane KP. Bacterial modulation of antigen processing and presentation. *Microbes Infect.* 2000 Feb;2(2):199-211. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00268-9.

Marteau F, Gonzalez NS, Communi D, Goldman M, Boeynaems JM, Communi D. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells, *Blood*, 2005 Dec 1;106(12):3860-6.

Matheus W, E. Câncer de Bexiga Pta, Ptis e Pt1 In: Manual de Urologia, Sociedade Brasileira de Urologia, São Paulo: Planmark, 2010; cap 17, p, 159.

McCarthy CJ, Ikeda Y, Skennerton D, et al. Characterisation of nerve-mediated ATP release from bladder detrusor muscle and its pathological implications. *Br J Pharmacol.* 2019;176(24):4720–30.

Messing EM, Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, et al. Urothelial tumors of the urinary tract, *Campbell's urology*, 8th ed, Philadelphia: Saunders 2002; p,2732-84.

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014; 27:16-25.

Moch, H. et al. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol*, 2001; 8:14-20.

Moreau M, Andre C, O'Connor JC, Dumich SA, Woods JA, et al. Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior, *Brain Behav, Immun* 2008; 22:1087–1095.

Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.* 1999; 189:1363–72.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism, *Science*, 1998; 21;281(5380):1191-3.

- Murphy WM, Busch C, and Algaba F. Intraepithelial lesions of urinary bladder: morphologic considerations. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2000; 67-81.
- Nelson BH. IDO and outcomes in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009; 115:179–80.
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor, *Immunity*, 1999; 11:141–51.
- Pan K, Wang H, Chen MS, Zhang HK, Weng DS, Zhou J, Huang W, Li JJ, Song HF, Xia JC. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:1247–53.
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, *Nat Rev Cancer*, 2012;12:252-264.
- Parodi A, Battaglia F, Kalli F, Ferrera F, et al. CD39 is highly involved in mediating the suppression activity of tumor-infiltrating CD8+ T regulatory lymphocytes, *Cancer Immunol Immunother*, 2013; 62(5):851-62.
- Pashos, C,L,, et al. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management, *Cancer Pract*, 2002; 10: 311.
- Phillips, B, et al. Oxford Centre for Evidence-based Medicine Levels of Evidence, Updated by Jeremy Howick March 2009.
- Piper JM, Tonascia J, Matanoski GM. Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years, *N Engl J Med* 1985; 313:292-5.
- Popov Z, Hoznek A, Colombel M. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder, *Cancer* 1997; 80: 1472-81.
- Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer, *Nature*, 2014; 515:558–62.
- Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF. Intravesical Evans strain BCG therapy: quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J Urol.* 1992;147:1636-42.
- Pryor K, Stricker P, Russell P, et al. Antiproliferative effects of bacillus Calmette-Guerin and interferon alpha 2b on human bladder cancer cells in vitro, *Cancer Immunol Immunother* 1995; 41(5):309-16.
- Pulte D, Furman RR, Broekman MJ, et al. CD39 expression on T lymphocytes correlates with severity of disease in patients with chronic lymphocytic leukemia, *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11:367–72.
- Raghavan D. Chemotherapy and cystectomy for invasive transitional cell carcinoma of bladder, *Urol Oncol*, 2003; 21:468–74.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):413–92.

- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413-492.
- Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ. Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity, *J Urol*, 1987 Jan; 137(1):155-8.
- Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer, *J Urol*, 1993 Sep; 150(3):1018-23.
- Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 1993;150:1018-23.
- Ratliff TL. Role of animal models in understanding intravesical therapy with bacille Calmette-Guerin. *Clin Infect Dis.* 2000;31 Suppl 3:S106-8.
- Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer, *N Engl J Med*, 2016 10; 375(19):1823-1833.
- Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer — A current perspective, *Nat Rev Urol*, 2014 Mar; 11(3):153-62.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2006; 2: 409-430.
- Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation, *SeminThrombHemost* 2005; 31:217–233.
- Rosenthal, MD, PhD; Ray G, Crispen, PhD; Margaret G, Thorne; Nancy Piekarski; NijoleRaisys; Philip G, Rettig, JD. BCG Vaccination and Leukemia Mortality; *JAMA*, 1972; 222(12):1543-1544.
- Saint F, Patard JJ, Irani J, Salomon L, Hoznek A, Legrand P, Debois H, Abbou CC, Chopin DK, Leukocyturia as a predictor of tolerance and efficacy of intravesical BCG maintenance therapy for superficial bladder cancer, *Urology* 2001; 57(4):617-21.
- Sattler C, Steinsdoerfer M, Offers M, Fischer E, Schierl R, Heseler K, Däubener W, Seissler J, Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation, *Cell Transplant*, 2011; 20(8):1221-30.
- Säve S, Persson K, Extracellular ATP and P2Y receptor activation induce a proinflammatory host response in the human urinary tract, *Infect Immun*, 2010; 78:3609–3615.
- Shabbir M, Ryten M, Thompson C, et al. Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer, *BJU Int* 2007;01: 106–12.
- Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy, *Cell*, 2017; 168(4):707–723.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020, *CA Cancer J Clin*, 2020;70:7–30.

Sivanathan KN, Rojas-Canales DM, Hope CM, Krishnan R, Carroll RP, Gronthos S, Grey ST, Coates PT. Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function, *Stem Cells*, 2015; 33(9):2850-63.

Sjodahl G, Lauss M, Lovgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma, *Clin Cancer Res*, 2012; 18(12):3377–86.

Smith, C. et al. IDO is anodal pathogenic driver of lung cancer and metastasis development. *Cancer Discov*. 2012; 2, 722–735

Stagg J, Divisekera U, Duret H, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res*. 2011;71(8):2892–900.

Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(4):1547–52.

Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer, *Oncogene* 2010; 29:5346–5358.

Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients, *J Clin Oncol*, 2001; 19(3):666–675.

Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Farias PF, et al. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines, *UrolOncol*, 2010; 28(3):260-7.

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*. 1991;351:456-60.

Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stöckle M, et al. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses, *Cancer Res* 2006; 15; 66(16):8250-7.

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials, *Eur Urol* 2006; 49:466–5.

Takao M, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Takakura S, Saito M, Saito M, Okamoto S, Takikawa O, Sasaki H. Increased synthesis of indoleamine-2, 3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2007;17:1333–1339.

Terness P, Chuang JJ, Bauer T, Jiga L, Opelz G. Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO? *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2480-6.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy, *Cancer cell*, 2015; 27:450–61.

Turbitt ML, Mackie RM. Loss of β 2 microglobulin from the cell surface of cutaneous malignant and premalignant lesions. *Br J Dermatol* 1981; 104: 507-513.

Ujházy P, Berleth ES, Pietkiewicz JM, Kitano H, Skaar JR, Ehrke MJ, Mihich E. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance, *Int J Cancer*, 1996; 15;68(4):493-500.

- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase, *Nat Med* 2003; 9:1269-1274.
- Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, et al. ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest.* 2005;115(9):2412–22.
- Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells, *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008; 134:365–372.
- Watanabe E, Matsuyama H, Matsuda K, Ohmi C, Tei Y, Yoshihiro S, Ohmoto Y, Naito K. Urinary interleukin-2 may predict clinical outcome of intravesical bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for carcinoma in situ of the bladder, *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52:481–6.
- Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4, *Science*, 1995; 270:985–8.
- Wettstein MS, Buser L, Hermanns T, et al. CD73 Predicts Favorable Prognosis in Patients with Nonmuscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer. *Dis Markers.* 2015; 785461.
- White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27(4):211–7.
- Wichers MC, Maes M. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-α-induced depression, *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29:11–7.
- Williamson SR, Montironi R, Lopez-Beltran A, et al. Diagnosis, evaluation and treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder: The state of the art. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010; 76:112-126.
- Witjes JA, Lebet T, Compérat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, Hernández V, Espinós EL, Dunn J, Rouanne M, Neuzillet Y, Veskimäe E, van der Heijden AG, Gakis G, Ribal MJ. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer, 2017; 71 (3): 462–475.
- Wu XR, He XS, Chen YF, Yuan RX, Zeng Y, Lian L, Zou YF, Lan N, Wu XJ, Lan P. High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer, *J Surg Oncol* 2012; 106:130–137.
- Yan H, Dong M, Liu X, Shen Q, He D, Huang X, et al., Multiple myeloma cell-derived IL-32γ increases the immunosuppressive function of macrophages by promoting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression. *Cancer Lett.* (2019) 446:38–48.
- Yang C, Zhou Y, Zhang L, Jin C, Li M, Ye L. Expression and function analysis of indoleamine 2 and 3-dioxygenase in bladder urothelial carcinoma, *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 1;8(2):1768-75.
- Zhai, L. et al. The role of IDO in brain tumor immunotherapy. *J. Neurooncol.* 2015; 123, 395–403.
- Zhang B, CD73 promotes tumor growth and metastasis, *Oncoimmunology*, 2012; 1:67–70.

Zhang B, Cheng B, Li FS, et al. High expression of CD39/ENTPD1 in malignant epithelial cells of human rectal adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 2015; 36:9411–9.

Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, Wei YQ. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature, 2012; 7:e50946.

Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, Yin L, Shao Z, Ou Z. Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix, *Cancer Biol Ther* 2007; 6(3):426-31.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature, *Drug Dev Res* 2001; 52:44–56.

Zimmermann H. Purinergic signaling in neural development. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22: 194-204.

Zlotta AR, Fleshner NE, Jewett MA. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update, *Can Urol Assoc J*, 2009; 3(6 Suppl 4):S199-205.