

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

O papel dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina e do receptor P2X7 no  
controle da proliferação e morte celular tumoral

PAOLA DE ANDRADE MELLO

PORTO ALEGRE, 2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

O papel dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina e do receptor P2X7 no  
controle da proliferação e morte celular tumoral

Tese apresentada por **Paola de  
Andrade Mello** para obtenção do  
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências  
Farmacêuticas

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréia Buffon  
**Coorientador:** Prof. Dr. Guido Lenz  
**Coorientador no exterior:** Prof. Dr. Simon Robson

PORTO ALEGRE, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 10 de Dezembro de 2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana Maria Oliveira Battastini  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Elizandra Braganhol  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Mello, Paola de Andrade

O papel dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina e do receptor P2X7 no controle da proliferação e morte celular tumoral / Paola de Andrade Mello. -- 2015.

146 f.

Orientadora: Andréia Buffon.  
Coorientador: Guido Lenz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. ATP. 2. Adenosina. 3. P2X7. 4. Câncer. 5. Alvos Terapêuticos. I. Buffon, Andréia, orient. II. Lenz, Guido, coorient. III. Título.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (Labsinal) do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Department of Medicine, Gastroenterology & Transplantation of Beth Israel Deaconess Medical Center, a teaching hospital of Harvard Medical School. A estudante recebeu bolsa de estudos da CAPES.



**Aos meus pais,**

a quem devo a vida e a minha formação moral.

Meu reconhecimento e gratidão pelo amor, paciência, compreensão e apoio

constante nesta jornada da vida.



## **AGRADECIMENTOS**

A prof<sup>a</sup>. Dra. Andréia Buffon e ao prof. Dr. Guido Lenz, exemplo de profissionais competentes, dedicados, éticos e humanos, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, apoio, compreensão e empolgação. Pela amizade e convívio.

Aos meus colegas do Laboratório de Análise Bioquímica e Citológica, em especial aos meus bolsistas de iniciação Jessica Nascimento e Camilo D'Amore. Agradeço imensamente a todo o apoio, a ajuda e a disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Ao doutor Eduardo Chiela por todo o apoio, orientação, disponibilidade e amizade durante esta etapa. Você foi fundamental no desenvolvimento do meu trabalho.

A professora Márcia Wink e seu grupo de pesquisa pelo apoio, ajuda e troca de experiências.

Ao meu supervisor no exterior, Dr. Simon Robson e a também a Dra. Yan Wu, pela orientação, amizade e dedicação durante o meu doutorado sanduíche na Harvard University.

A todos os colaboradores que participaram do desenvolvimento desta tese, muito obrigada pelo auxílio e colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

A CAPES, pelo auxílio financeiro tanto no Brasil quanto no exterior.

Aos meus pais, Celso e Sirlei, agradeço pela educação, apoio, incentivo, conforto, compreensão e amor incondicional.



## RESUMO

Estudos têm demonstrado que o microambiente tumoral é rico em ATP e adenosina, sugerindo o envolvimento da sinalização purinérgica no desenvolvimento e/ou manutenção do câncer. Ainda, o receptor purinérgico P2X7, conhecido pelo seu papel na indução de apoptose, encontra-se reduzido em alguns tecidos tumorais em comparação aos tecidos saudáveis, indicando que a sua redução possa ser um mecanismo de resistência celular à apoptose. Dessa forma, compreender o papel da sinalização purinérgica no contexto do câncer se torna indispensável e permite que novas abordagens terapêuticas sejam implementadas. Nesse trabalho, avaliamos a função dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina, bem como do receptor P2X7 na indução da morte celular em células de câncer cervical. Também verificamos o efeito do *heat shock* na potencialização da atividade do receptor P2X7 frente à curta exposição ao ATP em células de câncer de cólon. De acordo com os nossos resultados, o efeito citotóxico do ATP extracelular nas linhagens de câncer cervical é mediado principalmente pela ação do seu metabólito adenosina, que ao entrar no interior das células, promove o aumento dos níveis intracelulares de AMP, ativação de AMPK, aumento da p53 e indução de autofagia. O papel do receptor P2X7 nesse contexto parece ser apenas coadjuvante, visto que o seu bloqueio ou silenciamento impediu em apenas 20% a morte celular. Além disso, utilizando células de câncer de cólon, nós demonstramos que o *heat shock* aumenta a funcionalidade do receptor P2X7, independente da interação com *heat shock proteins* ou canais do tipo conexina/panexina, potencializando o efeito citotóxico do ATP. Esse efeito parece estar relacionado à mudanças na composição e arquitetura da membrana celular, visto que o uso do agente fluidizador de membrana benzil álcool foi capaz de mimetizar o efeito do *heat shock* na potencialização do receptor P2X7 a 37°C. Este estudo fornece evidências adicionais sobre o papel da sinalização purinérgica no contexto da biologia celular tumoral e abre novas perspectivas para o uso dos nucleotídeos de adenina associados a hipertermia como agentes adjuvantes na terapia do câncer. **Palavras-chaves:** ATP, Adenosina, P2X7, Sistema Purinérgico, Câncer Cervical, Câncer de Cólon, Alvos Terapêuticos.



## ABSTRACT

The tumor microenvironment is rich in ATP and adenosine, suggesting an involvement for purinergic signaling in cancer development and surveillance. The P2X7 receptor, among the P2 purinergic receptors, is broadly recognized as the “death receptor”, because it promotes cell apoptosis when exposed to high levels of extracellular ATP. Researches have been shown that P2X7 protein levels are decreased at the tumor site in comparison to adjacent healthy tissue, suggesting a mechanism of tumor escape to cell death. Thus, understanding purinergic signaling in a cancer context becomes urgent and opens a new field for therapeutic strategies. Here, we evaluated adenine nucleotides and nucleosides cytotoxicity, as well as P2X7 role in cell death induction using cervical cancer cell lines. Indeed, we investigated heat shock effect on P2X7 functionality through exposing colon cancer cell shortly to ATP at 40°C. According to our data, adenosine uptake formed from ATP metabolism is the main responsible for the extracellular ATP cytotoxicity in cervical cancer cells. While inside of the cell, adenosine is converted to AMP, leading to AMPK activation, p53 increase and autophagy induction. ATP induced cell death *per se* through P2X7 in this context seems to be less important, since P2X7 blockage or knocking down reduced only 20% of cell death. In colon cancer cells, we found that heat shock stress was able to increase P2X7 pore formation independently of heat shock protein interaction or native pore-forming transporters association (e.g pannexin-or connexin-type channels), thus leading to an increase ATP cytotoxicity. The mechanism enrolled in this process seems to be related to changes in the lipid composition and architecture of membrane, as the membrane fluidizer benzyl alcohol could reproduce heat stress effect in potentiating P2X7 activation at 37°C. In conclusion, our work provides further evidence for a purinergic signaling role in the cancer biology context and opens new perspectives for the utility of purine-based drugs associated to hyperthermia as adjunctive agents in cancer therapy. **Keywords:** ATP, Adenosine, Purinergic System, P2X7, Cervical Cancer, Colon Cancer, Therapeutical Target.



## SUMÁRIO

### I. Introdução

I.1 Sistema Purinérgico.....	19
I.2 ATP e adenosina extracelular no microambiente tumoral.....	20
I.3 Papel do ATP vs Adenosina extracelular no crescimento tumoral.....	22
I.3.1 Atividade pró-tumoral.....	22
I.3.2 Atividade anti-tumoral.....	22
I.4 O receptor P2X7 e suas peculiaridades.....	24
I.5 P2X7 e sua relevância no câncer.....	25
I.5.1. Atividade pró-cancerígena.....	26
I.5.2 Atividade anti-cancerígena.....	28
I.6 Expressão e funcionalidade do receptor P2X7 nos tumores sólidos.....	31
I.6.1 Câncer cervical.....	31
I.6.2 Câncer de cólon e reto.....	33
I.7 Sinalização Purinérgica como alvo terapêutico no câncer.....	33

### II. Objetivos.....37

### III. Artigos Científicos

<b>III.1. CAPÍTULO 1-</b> <u>Paola de Andrade Mello</u> , Eduardo C. Filippi-Chiela, Jéssica Nascimento, Aline Beckenkamp, Danielle Santana Bertodo, Fraciele Kipper, Emerson André Casali, Alessandra Nejar Bruno, Juliano Pancez, Luiz Fernando Zerbini, Márcia Rosângela Wink, Guido Lenz and Andréia Buffon. <b>Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells.</b> <i>Molecular Biology of the Cell</i> . 2014 Oct 1; 25(19): 205-18. doi: 10.1091/mbc.....	43
---	----

<b>III.2. CAPÍTULO 2- <u>Paola de Andrade Mello</u>, Shu Bian, Luiz Eduardo Baggio Savio, Jingping Zhang, Wolfgang Junger , Márcia Wink, Guido Lenz, Yan Wu, Andréia Buffon and Simon C. Robson. <b>Heat shock increases ATP-mediated cancer cell death by inducing P2X7 hyperactivation</b>.....</b>	<b>67</b>
<b>IV. Discussão geral.....</b>	<b>107</b>
<b>V. Conclusões Gerais.....</b>	<b>121</b>
<b>VI. Perspectivas.....</b>	<b>125</b>
<b>VII.Referências.....</b>	<b>129</b>

## I. Introdução

---



## I.1. Sistema Purinérgico

O sistema purinérgico é composto por três elementos principais, os nucleotídeos/nucleosídeos da adenina extracelulares, os receptores (purinoceptores) e as enzimas (ectonucleotidasas), que interagem entre si modulando o processo de sinalização purinérgica (Feng *et al.*, 2014). Em muitos casos, essa sinalização se inicia pela liberação do nucleotídeo ATP do meio intracelular para o extracelular (Idzko *et al.*, 2014). Uma vez presentes no meio extracelular, ATP e ADP podem atuar nos receptores purinérgicos P2, que são subdivididos em duas famílias: os receptores metabotrópicos P2Y e os receptores ionotrópicos P2X. Os receptores P2Y são acoplados a proteínas G e são subdivididos, por sua vez, nos tipos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e P2Y<sub>14</sub>. Já os receptores P2X atuam como canais ionotrópicos ativados por ATP e são divididos em sete subtipos (P2X1-7) (Di Virgilio, 2012; Burnstock & Di Virgilio, 2013; Idzko *et al.*, 2014; Roger *et al.*, 2014).

A ativação dos receptores P2 é finalizada pela difusão e hidrólise do ATP a adenosina. Este processo ocorre em duas etapas e é controlado principalmente pela ação da enzima nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase1 ou CD39), que converte ATP/ADP em AMP, seguido pela ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (CD73), que forma adenosina a partir do AMP. A adenosina formada no meio extracelular pode, por sua vez, atuar nos receptores purinérgicos P1, que são subdivididos em quatro tipos (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>), ser captada para o interior da células por meio de transportadores (ENTs) ou ser degradada a inosina por meio da ação da enzima adenosina deaminase (ADA), que se encontra tanto na membrana citoplasmática quanto no citoplasma das células (Idzko *et al.*, 2014; Roger *et al.*, 2014).

Dependendo dos níveis de ATP/adenosina que se encontram no meio extracelular e da ativação dos receptores P1 e P2, processos como quimiotaxia, ativação de células imunes, fagocitose, liberação de citocinas, proliferação, diferenciação, maturação, migração, adesão e morte celular são controlados (Di Virgilio, 2012; Roger *et al.*, 2014). Sendo assim, um desequilíbrio nessa sinalização pode ser um dos responsáveis pelo desenvolvimento de inúmeras patologias, inclusive o câncer (Feng *et al.*, 2014).

## I.2. ATP e adenosina extracelular no microambiente tumoral

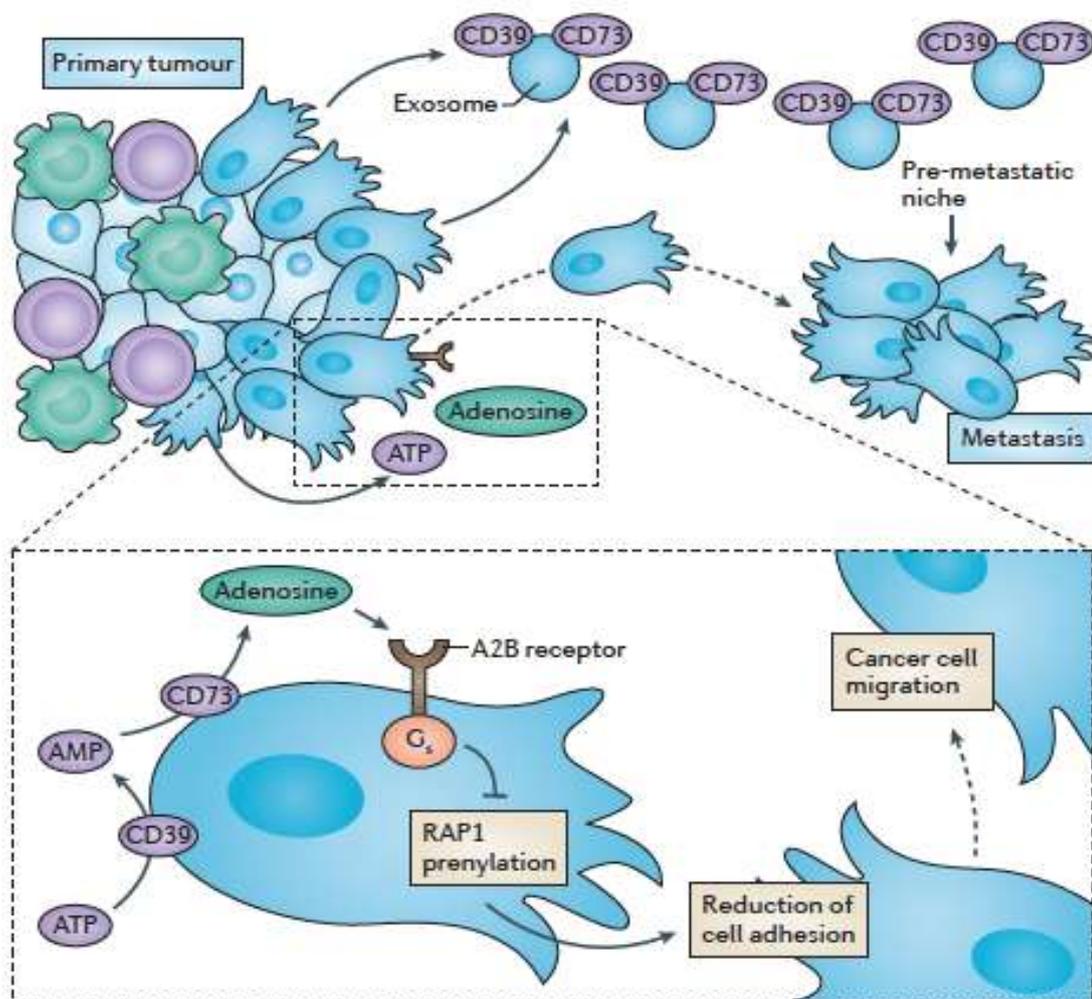
Em condições fisiológicas, o ATP encontra-se em altas concentrações no interior das células, na faixa de 3-10 mM, e em baixas concentrações no meio extracelular (em torno de 10 nM). Sendo assim, altas concentrações desse nucleotídeo no meio extracelular representa um sinal de dano tecidual e/ou stress celular, como uma molécula sinalizadora (Feng *et al.*, 2014; Roger *et al.*, 2014). No microambiente tumoral, estudos tem demonstrado que a concentração de ATP é relativamente alta, na faixa de mM, quando comparado aos tecidos saudáveis, onde é quase indetectável (Pellegatti *et al.*, 2008). Inicialmente, acreditava-se que esse ATP extracelular era secretado pelas células cancerígenas, mas estudos mais recentes indicam que a sua principal fonte é proveniente de células em processo de morte celular, principalmente aquelas localizadas em regiões de grande hipóxia nos tecidos tumorais sólidos (Wang *et al.*, 2004b; Roger & Pelegrin, 2011).

O papel do ATP extracelular no microambiente tumoral, modulando o desenvolvimento do câncer, vai depender do mecanismo pelo qual as células fonte deste nucleotídeo estão morrendo (necrose, apoptose, autofagia), do tipo de liberação pelas células (liberação passiva ou secreção ativa), da concentração de ATP no meio, do tipo de receptor purinérgico e da sinalização ativada. Portanto, dependendo do conjunto envolvido, o ATP extracelular pode gerar uma ação anti-tumoral com propriedades imunogênicas ou pró-tumoral, promovendo proliferação e migração das células cancerígenas (Roger *et al.*, 2014).

Assim como o ATP, a concentração de adenosina nos fluidos intersticiais em condições fisiológicas é extremamente baixa e o seu aumento no meio extracelular normalmente se deve a condições patológicas como hipóxia, isquemia, inflamação ou trauma, caracterizando um sinal de dano tecidual (Hasko *et al.*, 2008). Além desta liberação passiva, o aumento de adenosina no meio extracelular também pode ocorrer devido a uma alteração do metabolismo de componentes do sistema purinérgico, caracterizado pelo acelerado catabolismo de ATP extracelular e/ou da inibição da degradação de adenosina, encontrado em vários tipos de câncer (Linden, 2006) (Figura 1).

No microambiente neoplásico, a adenosina, quando acumulada, exerce um papel crucial na regulação autócrina e parácrina estimulando a

imunossupressão e a angiogênese e favorecendo desta forma o crescimento tumoral (Ohta *et al.*, 2006). Além deste efeito no estroma tumoral, a adenosina extracelular pode atuar diretamente nas células cancerígenas regulando a proliferação, diferenciação e apoptose. Sendo assim, o papel desse nucleosídeo no desenvolvimento, progressão e metástase tumoral se deve tanto a uma ação indireta no microambiente tumoral como também a uma ação direta sobre as células cancerígenas (Antonioli *et al.*, 2013).



**Figura 1. Adenosina formada pelo metabolismo do ATP no microambiente tumoral estimula a migração de células tumorais via receptores A2B.** As células tumorais, bem como exossomos produzidos por elas, expressam CD39 e CD73, levando ao aumento dos níveis de adenosina no microambiente tumoral. Este nucleosídeo quando ligado aos receptores A2B inibe vias de sinalização importantes para o processo de adesão celular, estimulando a migração tumoral. Adaptado de Antonioli *et al.*, 2013. Cópia autorizada por Nature Publishing Group, número da licença 3733201443155.

### **I.3. Papel do ATP vs Adenosina extracelular no crescimento tumoral**

Considerando a complexa via de sinalização purinérgica, a resposta final gerada pelos diferentes níveis de ATP *versus* adenosina no microambiente tumoral irá depender do painel de expressão e ativação dos diferentes subtipos de receptores P1 e P2 presentes no tecido, podendo ser tanto pró- ou anti-tumoral (Feng *et al.*, 2014).

#### **I.3.1. Atividade pró-tumoral**

Atividades pró-tumorais já foram descritas para os receptores P2Y<sub>1</sub> em câncer de tireóide (Pines *et al.*, 2005), P2Y<sub>2</sub> em melanoma, câncer de células escamosas, mama, pulmão, tireóide e fígado (Dixon *et al.*, 1997; Greig *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2003; White *et al.*, 2005a; White & Burnstock, 2006; Shabbir *et al.*, 2008b), P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>12</sub> em câncer de pulmão e astrocitoma (Schafer *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Nishimaki *et al.*, 2012; Sodelar o Bilbao & Boland, 2013; Burnstock & Di Virgilio, 2013; Ide *et al.*, 2014). Já os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> são amplamente conhecidos por seu papel na proliferação tumoral, tendo uma ação importante no estímulo da proliferação de células tumorais pulmonares, pancreáticas, intestinais e de próstata (Kalhan *et al.*, 2012; Mediavilla-Varela *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2013).

#### **I.3.2. Atividade anti-tumoral**

Rapaport em 1983 foi o primeiro a descrever o efeito citotóxico do ATP ao verificar que esse composto bloqueava o crescimento celular quando adicionado ao meio de cultura de células cancerígenas (pâncreas e cólon) (Rapaport, 1983). Desde então, muitos estudos avaliando a atividade anti-neoplásica do ATP, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, estão sendo publicados.

A redução na proliferação celular é resultado da ação conjunta dos processos de apoptose e diferenciação celular desencadeados pela ativação de vários subtipos de receptores purinérgicos pelo ATP (Feng *et al.*, 2014). Funções tumoricidas já foram descritas para os receptores P2X<sub>5</sub>/P2X<sub>7</sub> e/ou P2Y<sub>11</sub> em células de câncer de próstata (PC-3) e bexiga (HT-1376) (Fang *et al.*, 1992; Calvert *et al.*, 2004; Shabbir *et al.*, 2008b), bem como para os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> em células de melanoma, de câncer de cólon e de esôfago (Hopfner

*et al.*, 1998; Maaser *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005a; White *et al.*, 2005b; Coutinho-Silva *et al.*, 2005). Em linhagens celulares de neuroblastoma o efeito citotóxico do ATP extracelular é mediado basicamente pelos receptores P2X7, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> (Feng *et al.*, 2014).

Assim como o ATP, a adenosina também parece ter um efeito na redução do crescimento tumoral. A ativação do receptor A<sub>2A</sub> está associada à indução de morte celular em linhagens de câncer de cólon (Caco-2), hepatoma (HepG2), mieloma múltiplo e linfoma (Yasuda *et al.*, 2009; Serra *et al.*, 2011; Rickles *et al.*, 2012). Já o estímulo do receptor A<sub>1</sub> leva à indução de apoptose nas linhagens de câncer de cólon (CW2) (Saito *et al.*, 2010) e glioblastoma (Synowitz *et al.*, 2006). O receptor A<sub>3</sub>, dentre todos os receptores P1, é o mais conhecido pelo seu efeito citotóxico, inibindo o crescimento de uma variedade de tipos tumorais, dentre eles o linfoma, melanoma, câncer de próstata, pulmão, cólon, câncer neural e carcinoma hepatocelular (Fishman *et al.*, 2000; Bar-Yehuda *et al.*, 2001; Merighi *et al.*, 2002; Fishman *et al.*, 2002; Madi *et al.*, 2003; Fishman *et al.*, 2004; Aghaei *et al.*, 2011; Bar-Yehuda *et al.*, 2008; Otsuki *et al.*, 2012; Aghaei *et al.*, 2012; Vincenzi *et al.*, 2012). Além do seu efeito citotóxico direto via receptores P1, a adenosina pode induzir apoptose quando captada para o interior das células via transportadores de membrana (ENTs). Esse mecanismo de morte celular já foi descrito para as linhagens de câncer de mama (MCF-7) (Tsuchiya *et al.*, 2012), astrocitoma (RCR1) (Sai *et al.*, 2006) e câncer gástrico (GT3-TKB) (Saitoh *et al.*, 2004).

Essa ambigüidade da sinalização purinérgica com relação ao crescimento tumoral ainda não está totalmente elucidada. O que se sabe é que a presença nos tecidos tumorais de um ou vários tipos de receptores purinérgicos com diferentes sensibilidades aos níveis de ATP/adenosina no meio extracelular geram distintas vias de sinalização intracelular, que interagem/concorrem para produzir uma resposta celular final, que pode ser de crescimento, quiescência ou morte (White & Burnstock, 2006; Pellegatti *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2010; Wilhelm *et al.*, 2010; Michaud *et al.*, 2011).

#### I.4. O receptor P2X7 e suas peculiaridades

Dentre os subtipos de receptores P2X, o receptor P2X7 é peculiar e apresenta características únicas que vão desde a sua estrutura molecular até as suas propriedades biofísicas e farmacológicas (Jiang *et al.*, 2013). Com relação a sua estrutura molecular, o receptor P2X7 difere dos demais por apresentar uma cauda carboxi-terminal. Já em relação as propriedades funcionais, ele é o único receptor capaz de responder a altas concentrações de ATP (acima de 1 mM) e formar poros permeáveis a grandes moléculas (até 900 Da). A formação do poro só ocorre após estímulo continuado por altas concentrações de ATP e é considerado o principal mecanismo envolvido na indução de apoptose celular (Adinolfi *et al.*, 2005; Burnstock & Di Virgilio, 2013; Roger *et al.*, 2014).

Apesar de ser um canal iônico, o receptor P2X7 também poder interagir com 11 diferentes proteínas formando um complexo protéico responsável pela geração do sinal intracelular (Kim *et al.*, 2001). Dentre essas 11 proteínas, três são moléculas da matrix extracelular: laminina  $\alpha 3$ , integrina  $\beta 2$  e proteína tirosina fostase do tipo receptor  $\beta$  (RPTP $\beta$ ); e oito são proteínas intracelulares:  $\alpha$ -actinina 4,  $\beta$ -actina, supervilina, três *heat shock proteins* (Hsp90, Hsc71 e HsP70), fosfatidilinositol 4-quinase 230 (PI4K) e guanitalo quinase P55 associada a membrana (MAGuK). Ainda não se sabe exatamente a função de cada proteína nesse contexto, mas estudos sugerem que elas possam controlar o funcionamento do canal iônico do receptor P2X7. Por exemplo, o bloqueio da atividade da enzima RPTP $\beta$  leva ao aumento da fosforilação da tirosina do receptor P2X7, culminando em maior atividade do mesmo (Kim *et al.*, 2001). Outro caso, é o controle exercido pela *heat shock protein 90* (Hsp90), cuja fosforilação da tirosina parece levar à inibição da função do receptor P2X7 (Adinolfi *et al.*, 2003). Desta forma, a ativação do receptor P2X7 parece ser muito mais complexa do que uma simples abertura de poro na membrana celular e mais estudos para elucidar essas interações são necessários.

O P2X7 é amplamente distribuído em células do sistema imune como monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T, mastócitos e células de Langerhans, onde participa fortemente da resposta imune levando a

ativação do inflamassoma e da caspase-1, com conseqüente estímulo da liberação de IL-1 $\beta$  pró-inflamatória pelos macrófagos e microglia (Ferrari *et al.*, 1997; Di Virgilio, 2007). Também pode ser encontrado em células ósseas como osteoblastos (Gartland *et al.*, 2001; Gartland *et al.*, 2012) e osteoclastos (Gartland *et al.*, 2013); em células epiteliais (Garcia-Marcos *et al.*, 2003; Pochet *et al.*, 2007) e renais (Hillman *et al.*, 2002), sendo portanto importante para a resposta ao ATP extracelular principalmente em células não-excitáveis.

### **I.5. P2X7 e sua relevância no câncer**

Conhecido como “o receptor da morte”, o P2X7 tem sido apontado como o principal receptor envolvido na indução de morte celular pelo ATP extracelular em vários tipos de câncer, como o melanoma (Feng *et al.*, 2011; Shabbir & Burnstock, 2009; Bian *et al.*, 2013), carcinomas de células escamosas (Deli & Csernoch, 2008), glioma (Gehring *et al.*, 2012), câncer cervical (Wang *et al.*, 2004a) e câncer endotelial (Li *et al.*, 2006). A formação do poro na membrana plasmática, característica desse receptor quando exposto à altas concentrações de ATP ou benzoil-ATP (BzATP), leva ao aumento da concentração intracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), à reorganização do citoesqueleto, à externalização da fosfatidil serina na membrana plasmática, à formação de corpos apoptóticos e conseqüentemente indução de apoptose celular (Feng *et al.*, 2014). Ainda, baixos níveis de expressão ou defeito no seu funcionamento estão sendo associados ao desenvolvimento do câncer, visto que esse seria um mecanismo de escape das células tumorais ao efeito pró-apoptótico deste receptor (Huang *et al.*, 2013).

Sendo assim, durante a última década, muitos estudos tem avaliado a expressão do receptor P2X7 em diferentes tecidos tumorais e em linhagens celulares de câncer com a finalidade de utilizá-lo como um marcador diagnóstico e/ou como um alvo terapêutico no tratamento do câncer (Feng *et al.*, 2014, Roger *et al.*, 2014). No entanto, a expressão do receptor P2X7 e a sua funcionalidade parecem variar de acordo com o tipo celular e com o método utilizado para a sua detecção. Alguns estudos tem demonstrado uma redução na sua expressão, diferentemente de outros que reportam um aumento nos níveis de RNAm, de proteína ou de ambos em comparação ao tecido normal (Roger *et al.*, 2014). Ainda, nos tumores que expressam P2X7 a

sua ativação pode levar à indução de morte celular (efeito anti-cancerígeno) ou ao estímulo da proliferação celular (efeito pró-cancerígeno), dependendo do tipo celular estudado e dos níveis de ATP no meio extracelular (Roger *et al.*, 2014).

### **I.5.1 Atividade pró-cancerígena**

O receptor P2X7 pode contribuir de forma direta e/ou indireta na proliferação celular. Indiretamente, sua ação se dá através da liberação de baixas quantidades de ATP no meio extracelular (Ohshima *et al.*, 2010; Hattori *et al.*, 2012) e diretamente através da sua atividade trófica, basal, quando não estimulado por grandes quantidades de ATP exógeno (Di Virgilio *et al.*, 2009).

O seu papel no crescimento celular já foi descrito em vários tipos tumorais. Em células de melanoma (B16/F10), o bloqueio farmacológico do receptor P2X7 com o antagonista A438079 ou a redução da sua expressão gênica com RNA de interferência (RNAi), levou a uma redução significativa da proliferação celular *in vitro*. Ainda, camundongos inoculados com células B16/F10 que foram tratados com o antagonista do P2X7, ATP oxidado (oATP), apresentaram uma redução significativa no crescimento tumoral quando comparados com o grupo controle (Hattori *et al.*, 2012). Em células de neuroblastoma (Neuro-2), o tratamento das células com apirase (enzima que hidrolisa ATP) ou oATP ou BBG (antagonista inespecífico do P2X7) levou a uma diminuição significativa da viabilidade celular (Wu *et al.*, 2009). Em células de carcinoma de ovário (SKOV-3 e CAOV-3) o estímulo do P2X7 com o seu agonista seletivo BzATP gerou um aumento nos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  e da fosforilação da AKT (pAKT) e ERK (pERK), duas principais vias de sinalização da proliferação celular. Ainda, esse efeito foi completamente bloqueado pelo uso do antagonista do P2X7, A438079. De acordo com os autores, a atividade basal do receptor P2X7, induzida pela auto-liberação de ATP, gerou o aumento dos níveis de pAKT e pERK, o que culminou na manutenção da viabilidade celular (Vazquez-Cuevas *et al.*, 2014).

A idéia de que o estímulo basal do receptor P2X7 seja crucial para a manutenção da proliferação celular vem sendo defendida por Di Virgilio e colaboradores (Di Virgilio *et al.*, 2009). Segundo estes autores, a atividade

basal do P2X7 poderia suportar diferentes aspectos celulares que são críticos para os processos de transformação oncogênica, proliferação celular e crescimento tumoral. Para comprovar esta hipótese, células humanas embrionárias de rim (HEK293) foram transfectadas com o receptor P2X7 humano *full-length*. Diferentemente das células controle, as células transfectadas apresentaram uma alta capacidade de permeabilização, um alto potencial mitocondrial de repouso, uma maior concentração basal de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial e uma maior concentração de ATP intracelular, o que resulta numa maior atividade mitocondrial. Esta última, por sua vez, leva ao aumento da proliferação celular e confere as células resistência para crescer em meio desprovido de soro. Interessantemente, todos esses efeitos foram abolidos na presença de apirase, demonstrando a dependência do estímulo tônico do P2X7 pelo ATP liberado de forma autócrina/parácrina no meio extracelular. Como o esperado, o estímulo contínuo do P2X7 à altas concentrações de ATP exógeno resultaram em morte celular (Adinolfi *et al.*, 2005). Os mesmos autores demonstraram ainda o crescimento tumoral dessas células transfectadas com P2X7 *in vivo*. De acordo com esse estudo, as células HEK293 expressando P2X7 apresentaram um fenótipo mais tumorigênico e anaplástico, secretaram altas quantidades de VEGF e possuíram um alto potencial angiogênico quando comparado com as células controle. Além disso, o crescimento tumoral foi reduzido pela injeção intratumoral de oATP e de um anticorpo anti-VEGF (Avastin) (Adinolfi *et al.*, 2012).

Além do efeito na proliferação celular, o receptor P2X7 também parece ter um papel importante na indução da migração e invasão tumoral. Estudos realizados com células de glioma (C6) mostram que o estímulo com BzATP produz um aumento na expressão gênica (RNAm) e protéica do P2X7. Ainda, esse tratamento com BzATP leva a um aumento significativo na migração celular (Wei *et al.*, 2008). Estudos com linhagens de células de câncer de mama altamente invasivas como MDA-MB-435 mostram que a ativação do receptor P2X7 pelo ATP leva à liberação de cisteíno-catepsinas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, facilitando desta forma a invasão tumoral. E mais, o bloqueio farmacológico do P2X7 tanto por antagonistas competitivos quanto não-competitivos, assim como a redução da sua

expressão pelo uso de siRNA, inibem significativamente a capacidade de invasão basal das células, ou seja, na ausência de estímulo exógeno pelo ATP (Jelassi *et al.*, 2011; Jelassi *et al.*, 2013). Estes dados reforçam a hipótese de que a ativação basal do receptor P2X7 pelo ATP endógeno liberado de forma autócrina/parácrina pelas células tumorais locais é importante para o efeito pró-tumoral do P2X7 (Roger *et al.*, 2014). Em contrapartida, estudos com linhagens celulares de câncer de pulmão, A549, PC-9 e H292, demonstram que tanto a ativação do P2X7 pelo ATP e BzATP exógenos, quanto pelo ATP endógeno, levam ao aumento da invasão celular. Ainda, esse efeito é bloqueado tanto pelo antagonista sintético (A438079) quanto pelo antagonista natural (emodin) do receptor P2X7 (Jelassi *et al.*, 2013; Takai *et al.*, 2012. Takai *et al.*, 2014).

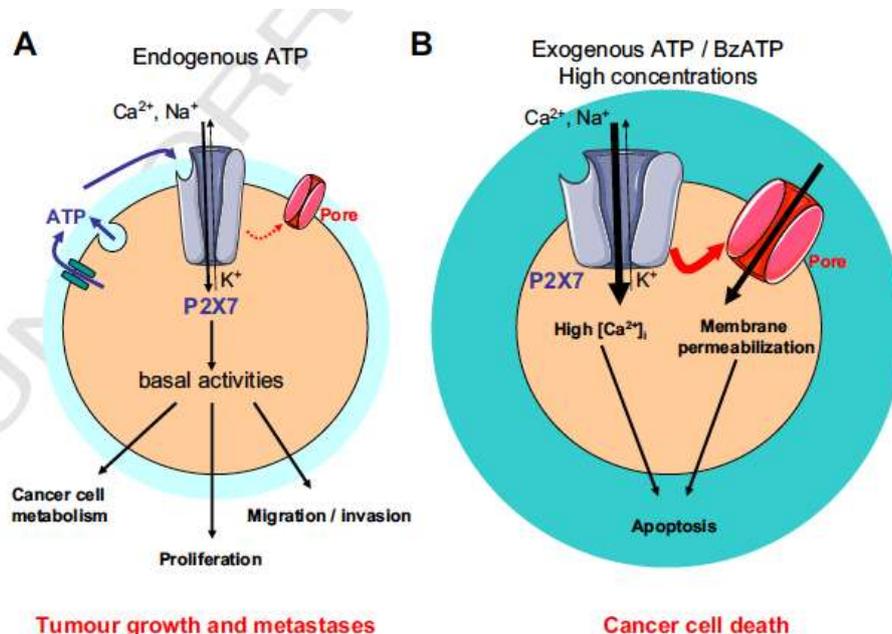
Um último ponto a ser considerado é o efeito do receptor P2X7 na adaptação celular metabólica ao microambiente tumoral. Em algumas regiões tumorais de intensa taxa de proliferação, ocorrem pontos de hipóxia com conseqüente liberação e ativação do fator induzível por hipóxia 1 humano (HIF-1 $\alpha$ ). Em linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 a produção de HIF-1 $\alpha$  leva ao aumento da expressão do receptor P2X7, que por sua vez ativa as vias ERK1/2 e AKT e aumenta a atividade das metaloproteinases MMP-2 e 9 (Tafari *et al.*, 2013). Sendo assim, o receptor P2X7 parece ser não apenas responsável pela manutenção da viabilidade celular como também pela invasão tumoral.

### **1.5.2 Atividade anti-cancerígena**

Diferentemente, quando estimulado por altas concentrações de ATP, por um longo período de tempo, o receptor P2X7 passa a ter uma atividade anti-tumoral, induzindo apoptose em muitos tipos de células cancerígenas. Desta forma, acredita-se que os níveis de ATP encontrados no meio extracelular e o tempo de ativação do receptor P2X7 é que irão ditar o efeito final sobre o tumor (Figura 2) (Roger *et al.*, 2014).

Vários estudos utilizando linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231) (Huang *et al.*, 2013), carcinoma de células escamosas (A431) (Greig *et al.*, 2003), adenocarcinoma de cólon (HCT8, Caco-2, MCA38) (Coutinho-Silva *et al.*, 2005; Bian *et al.*, 2013), melanoma (A375, B16) (White *et al.*, 2005b; Bian *et al.*, 2013) e glioma (GL261) (Tamajusuku *et al.*, 2010)

relatam a indução de apoptose mediada pelo receptor P2X7 após o estímulo exógeno de altas concentrações de ATP ou de BzATP. Nestes estudos a formação do poro com conseqüente aumento da permeabilização da membrana e do  $[Ca^{2+}]_i$  são os fatores que precedem a ativação do processo de apoptose.



**Figura 2. Representação esquemática do papel do receptor P2X7 na biologia celular do câncer epitelial.** (A) Em células de câncer epitelial, a liberação autócrina/parácrina de ATP, por difusão transmembranar ou por liberação de vesículas, leva à formação de um halo pericelular que ativa o receptor P2X7 num nível basal, com fraca ou sem permeabilização da membrana e que culmina no aumento do metabolismo, proliferação, migração e invasão celular. (B) A estimulação exógena do P2X7 com altas concentrações de ATP ou BzATP promove uma hiper-ativação do receptor, com conseqüente aumento da concentração do  $Ca^{2+}$  intracelular e da permeabilização da membrana. Nesse nível de ativação, o receptor P2X7 induz morte celular via apoptose. Adaptado de Roger *et al.*, 2014. Cópia autorizada por Elsevier, número da licença 1982084.

O efeito do ATP e BzATP, combinados ou não com a irradiação (2Gy), na morte de linhagens celulares humanas de glioma radioresistentes (U-138MG e U-251MG) e radiosensíveis (M059J) também foram relatadas (Gehring *et al.*, 2012). De acordo com os autores, as células sensíveis à radioterapia apresentaram maiores níveis de expressão protéica do receptor P2X7 e foram também sensíveis aos efeitos citotóxicos de agonistas do receptor. Em contrapartida, as células resistentes à radiação apresentaram menores níveis de expressão do receptor e foram também resistentes à morte

celular induzida tanto pelo ATP quanto pelo BzATP. Neste estudo, os autores enfatizaram a relevância da ativação do receptor P2X7 no aumento da sensibilidade dos gliomas à radioterapia, mas ressaltam a necessidade de mais estudos para provar essa hipótese.

O efeito anti-tumoral do P2X7 também foi demonstrado em estudos *in vivo*. Camundongos atímicos inoculados com células humanas de melanoma A375 e tratados diariamente com 50 mM de ATP por 39 dias apresentaram uma redução no volume tumoral de 50% e nenhuma perda no peso corporal quando comparados com os animais controle (White *et al.*, 2009). Em um modelo animal de câncer de pele induzido pela administração cutânea do agente carcinogênico DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) e do promotor carcinogênico TPA (acetato de tetradecanoilforbol), a aplicação tópica de 100  $\mu$ M de BzATP levou a uma redução no tamanho da lesão tumoral e a um aumento na sobrevivência dos animais (Fu *et al.*, 2009). Em ambos os estudos os autores propõem o uso de agonistas do receptor P2X7 como uma nova forma de tratamento do câncer.

Recentemente Dr. Robson e seu grupo de pesquisa descreveram uma nova via de sinalização envolvida no processo de indução de morte celular após ativação do receptor P2X7 (Bian *et al.*, 2013). De acordo com os autores, após o estímulo agudo das células de adenocarcinoma de cólon (MCA38) e de melanoma (B16/F10) com 5 mM de ATP e 2 mM de BzATP, a via de sinalização PI3K/AKT é inibida e a via AMPK-PRAS40-mTOR é estimulada de forma integrada e dependente do receptor P2X7, resultando em morte celular. Nesse trabalho, os autores demonstraram pela primeira vez o papel da autofagia na indução de morte celular via ativação do receptor P2X7. A autofagia é um processo celular fisiológico que leva a degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas celulares danificadas a fim de manter a homeostase celular em condições adversas, como privação de nutrientes, presença de patógenos e toxinas (Filippi-Chiela *et al.*, 2011). Quando hiperestimulada a autofagia induz à morte celular ao invés de auxiliar na sobrevivência e adaptação celular (He and Klionsky, 2009; Yang and Klionsky, 2010). O receptor P2X7 parece induzir o processo de autofagia pelo fato de causar um desequilíbrio dos níveis dos nucleotídeos de adenina intracelulares,

promovendo um aumento da razão AMP/ATP, que representa o sinal intracelular de gasto metabólico.

Mais que um efeito na indução da morte celular, a ativação do receptor P2X7 por agonistas exógenos também parece ser importante para a inibição da migração celular. Um estudo recente utilizando linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231, Py8119) mostra que o tratamento das células com o análogo não-hidrolizável do ATP, ATPγS, reduz o crescimento e a migração celular *in vitro* e inibe o crescimento tumoral *in vivo* (Zhou *et al.*, 2014).

Considerando todos esses estudos, pode-se dizer que o efeito anti-proliferativo ou pró-apoptótico do receptor P2X7, após o estímulo exógeno, está intimamente associado com a sua capacidade de indução da permeabilização da membrana plasmática. Acredita-se que em alguns tipos de câncer, apesar do receptor P2X7 ser totalmente funcional como um canal iônico, ele não é capaz de induzir a permeabilização da membrana, devido a presença de uma variante truncada na região C-terminal do receptor ou a sua incapacidade de se ligar a canais formadores de poros como a panexina-1. Sendo assim, nesses casos, o receptor P2X7 pode estar envolvido com o controle de outros processos celulares como a invasão celular, por exemplo. Se esta hipótese for verdadeira, a indução seletiva da permeabilização da membrana plasmática em células tumorais e não a manipulação do receptor P2X7 *per se* pode representar uma nova estratégia no tratamento do câncer (Roger *et al.*, 2014).

## **1.6. Expressão e funcionalidade do receptor P2X7 nos tecidos tumorais sólidos**

### **1.6.1 Câncer cervical**

O câncer da cérvix uterina é a quarta neoplasia mais frequente entre as mulheres no mundo, sendo que para o ano de 2012 foram esperados cerca de 528.000 novos casos (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, esta patologia detém o terceiro lugar em incidência e o quarto em mortalidade e no ano passado as estatísticas apontavam cerca de 17.540 novos casos (INCA, 2014). Essa diferença na incidência se deve à falta de acesso da população ao sistema de

screening e prevenção, como o exame do Papanicolaou e atualmente à vacina contra o HPV (vírus do papiloma humano) nas regiões menos desenvolvidas.

Embora a maioria dos casos de câncer cervical sejam relacionados com a infecção pelo HPV, apenas a presença do vírus não é suficiente para desencadear o processo de carcinogênese. Para que a ocorra a progressão tumoral é necessário que alterações nos processos de crescimento e diferenciação das células epiteliais também estejam presentes (Schiffman *et al.*, 2011). É nesse contexto que o estudo do receptor P2X7 se tornou um alvo interessante no entendimento da biologia celular do câncer cervical.

Várias publicações tem relacionado a redução da expressão do receptor P2X7 com o desenvolvimento do câncer cervical. Gorodeski e colaboradores foram os primeiros a verificar que os níveis de RNAm e proteína do receptor P2X7 são menores em células escamosas de carcinoma escamoso e em adenocarcinomas endocervical e endometrial quando comparados com células epiteliais normais provenientes da região do endométrio, da endocérvice e da ectocérvice (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Ainda, lesões hiperplásicas pré-cancerígenas do endométrio já apresentavam uma expressão reduzida do receptor quando comparado ao tecido normal.

Essa redução da expressão do receptor P2X7 pode ser justificada pela presença dos micro RNAs miR-186 e miR-150 que estão aumentados nas células de câncer cervical (Zhou *et al.*, 2008). Ou ainda, pela presença de uma variante truncada do receptor P2X7 (P2X7j) que parece interferir na ativação do receptor *full length* (P2X7A). Essa variante é desprovida da região C-terminal e portanto é incapaz de formar poros e induzir apoptose. A expressão de P2X7j é similar nas células normais e de câncer cervical, mas a expressão do receptor P2X7A é maior nas células normais. Sendo assim, acredita-se que a variante P2X7j apresente um efeito inibitório sobre o receptor P2X7A, que se torna incapaz de induzir apoptose mesmo sob o estímulo do BzATP (Feng *et al.*, 2006a; Feng *et al.*, 2006b).

Esses estudos indicam que o receptor P2X7, bem como a sua variante truncada (P2X7j) podem ser usados como novos biomarcadores no estudo do câncer cervical.

### **1.6.2 Câncer de cólon e reto**

O câncer de cólon e reto é o terceiro tipo de câncer mais frequente entre os homens (746.000 casos) e o segundo entre as mulheres (614.000 casos) em todo mundo (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, as estatísticas apontam as mesmas frequências encontradas para o mundo, sendo que para o ano de 2014 foram esperados cerca de 15.070 novos casos para homens e 17.530 novos casos para mulheres (INCA, 2014). Diferentemente do câncer cervical, o câncer de cólon e reto é mais frequente em países mais desenvolvidos e está intimamente relacionado com os hábitos de alimentares e de vida.

Estudos sobre a expressão tecidual do receptor P2X7 em tumores de cólon e reto são limitados e não conclusivos. Um estudo realizado com biópsias de tecido humano mostrou que o receptor P2X7A encontra-se na região basolateral do epitélio intestinal normal, enquanto que em células de adenocarcinoma de cólon o receptor encontra-se amplamente distribuído nas células. Ainda, em todos os casos estudados não foram encontrados diferenças nos níveis de receptor P2X7 nas células normais e de adenocarcinoma (Li *et al.*, 2009).

Considerando a alta incidência do câncer de cólon e reto no mundo e no Brasil, a busca de novos marcadores moleculares que possam ajudar no seu diagnóstico, prognóstico e tratamento se torna de suma importância. Com relação ao receptor P2X7, mais estudos são necessários a fim de avaliar o seu papel no desenvolvimento desse tipo tumoral.

## **1.7 Sinalização Purinérgica como alvo terapêutico no câncer**

Duas abordagens terapêuticas podem ser consideradas no uso da sinalização purinérgica no tratamento do câncer, o sistema imune do hospedeiro e/ou o próprio tecido tumoral (Di Virgílio, 2012). Com relação ao sistema imune do hospedeiro, sabe-se que a adenosina apresenta um papel importante na imunossupressão enquanto o ATP exerce um papel crucial na ativação da via P2X7/inflamassoma, levando ao recrutamento das células imunes à região tumoral (Ghiringhelli *et al.*, 2009; Michaud *et al.*, 2011).

Vários modelos experimentais de tumores mostram que uma redução nos níveis de adenosina está claramente relacionada à uma parada da

progressão tumoral e à prevenção de metástases (Stagg *et al.*, 2011). Essa redução da concentração de adenosina no interstício tumoral pode ser alcançada por meio da inibição da atividade das enzimas CD39 e/ou da CD73, ou alternativamente por meio do aumento da concentração da enzima ADA na região tumoral através do uso de um conjugado PEG-ADA direcionado ao tumor (Sauer *et al.*, 2012). O bloqueio da enzima CD39, pelo uso de inibidores ou anticorpos monoclonais parece ser a melhor estratégia terapêutica visto que a sua inibição resulta tanto no bloqueio da formação de adenosina, quanto no acúmulo do ATP (Di Virgilio, 2012; Feng *et al.*, 2014).

Com relação a abordagem terapêutica no tecido tumoral, a manipulação da sinalização purinérgica é mais complicada e controversa. Levando-se em conta o efeito pró-apoptótico do receptor P2X7 quando exposto a altas concentrações de ATP ou BzATP (Wang *et al.*, 2004a), o uso de agonistas seletivos com a finalidade de induzir a morte do tecido tumoral pode ser apontada com uma opção terapêutica (White & Burnstock, 2006). No entanto, considerando-se a atividade pró-tumoral do receptor P2X7, a estratégia oposta também é válida e o uso de antagonistas do receptor pode ajudar a prevenir o crescimento tumoral e a formação de metástases (Roger & Pelegrin, 2011). Experimentos *in vivo* mostram que as duas opções são válidas, mas o resultado final varia de acordo com o tipo de tumoral (Di Virgilio, 2012).

O uso da adenosina também pode ser considerado controverso, levando-se em conta o seu efeito anti ou pró-tumoral. De qualquer forma, o efeito final da administração de agonistas ou antagonistas dos receptores P1 vai depender dos diferentes subtipos de receptores presentes no tecido tumoral, podendo resultar tanto em estímulo da proliferação, liberação de VEGF ou apoptose (Di Virgilio, 2012). Dentre todos os receptores P1, o receptor A3 parece ser o alvo terapêutico mais promissor no combate ao câncer (Varani *et al.*, 2011).

Finalmente, alguns estudos clínicos avaliaram a aplicação terapêutica do ATP intravenoso em pacientes com câncer (Agteresch *et al.*, 2000; Beijer *et al.*, 2009). Os resultados mostram que apesar de ser bem tolerado e melhorar o estado nutricional e a qualidade de vida dos pacientes, o ATP não teve efeito significativo na redução do tamanho tumoral.

Apesar de ambíguo, o sistema purinérgico, com os seus nucleotídeos de adenina, receptores e enzimas está emergindo com um novo e importante alvo terapêutico no tratamento do câncer. No entanto, mais estudos são necessários para que o real papel desse sistema seja compreendido e possa ser implementado na prática clínica.

Considerando essa necessidade, a presente tese busca trazer novas informações sobre o papel dos nucleotídeos de adenina e do receptor P2X7 no desenvolvimento e indução de morte celular do câncer cervical e de cólon. Esse trabalho se apóia na hipótese de que o receptor P2X7 possa estar envolvido com o mecanismo de morte e resistência celular, podendo ser um novo alvo para a pesquisa terapêutica do câncer e também um possível marcador de agressividade tumoral.



## II. Objetivos

---



Considerando o papel do receptor P2X7 na indução de morte celular em alguns tipos tumorais e a busca urgente por novos alvos terapêuticos no tratamento do câncer esta tese tem como objetivo geral estudar o envolvimento do receptor P2X7 no mecanismo de morte e desenvolvimento tumoral em linhagens celulares de carcinoma cervical e adenocarcinoma de cólon.

Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Investigar o mecanismo pelo qual o ATP induz apoptose na linhagem de carcinoma cervical SiHa, via ativação dos receptores P2X7;
2. Investigar o efeito do ATP na proliferação e indução de apoptose, na linhagem celular SiHa silenciada para o gene do receptor P2X7;
3. Avaliar o efeito dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e do nucleosídeo adenosina, na proliferação e morte celular, em células de carcinoma cervical HeLa e C33A;
4. Avaliar o efeito do *Heat Shock* e do ATP na indução de morte celular pelo receptor P2X7, utilizando linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon (MCA38), silenciadas ou não para o gene do receptor P2X7.
5. Investigar o mecanismo envolvido nesse efeito citotóxico do *Heat Shock* + ATP.



### **III. Artigos Científicos**

---



### III. 1. CAPÍTULO 1

O capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 45-65.

Mello Pde A, Filippi-Chiela EC, Nascimento J, Beckenkamp A, Santana DB, Kipper F, Casali EA, Nejar Bruno A, Paccez JD, Zerbini LF, Wink MR, Lenz G, Buffon A. *Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells.* Mol Biol Cell. 2014 Oct 1;25(19):2905-18. doi: 10.1091/mbc.E14-01-0042. Epub 2014 Aug 7.















































### III.2. CAPÍTULO 2

O texto completo do capítulo 2, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 69-105, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta no descobrimento de um novo mecanismo para aumentar a atividade do receptor P2X7 frente à curta exposição ao ATP em células de câncer de cólon. Nesse trabalho, nós demonstramos que o *heat shock* aumenta a funcionalidade do receptor P2X7, independente da interação com *heat shock proteins* ou canais do tipo conexina/panexina, potencializando o efeito citotóxico do ATP. Esse efeito parece estar relacionado à mudanças na composição e arquitetura da membrana celular, visto que o uso do agente fluidizador de membrana benzil álcool gerou os mesmos efeitos do *heat shock* na hiperativação do receptor P2X7 a 37°C.















































































## **IV. Discussão Geral**

---



Câncer é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de doenças causadas por uma proliferação anormal e acelerada das células do organismo. As células cancerígenas apresentam a capacidade comum de ultrapassar a membrana basal dos tecidos e atingir órgãos distantes do corpo, caracterizando o processo conhecido como metástase (WHO, 2015). É essa capacidade de gerar metástases que faz do câncer uma doença com altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo que para o ano de 2012 foram esperados cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em todo mundo (GLOBOCAN, 2012). O câncer de pulmão (1,59 milhões), fígado (745.000), estômago (723.000), cólon e reto (694.000), mama (521.000) e esôfago (400.000), foram os que mais levaram pacientes à óbito no ano de 2012 (GLOBOCAN, 2012). A taxa de incidência do câncer nos homens é cerca de 25% maior do que nas mulheres e os principais sítios de desenvolvimento da doença também variam conforme o sexo. Nos homens, o câncer de pulmão, próstata, cólon e reto, estômago e fígado são os mais prevalentes em ordem decrescente; já nas mulheres o perfil muda para o câncer de mama, cólon e reto, pulmão, cérvix e estômago (WHO, 2015).

As causas que levam ao desenvolvimento desta doença são variadas e formadas basicamente pela interação de dois fatores: o genético e o ambiental. Cerca de 80-90% dos casos são relacionados aos fatores ambientais, como tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, hábitos sexuais, medicamentos, fatores ocupacionais e a radiação solar (INCA, 2014). Dentre todos esses fatores, o uso do tabaco é considerado o fator de maior risco, sendo correlacionado com a morte de 20% dos pacientes com câncer em geral e 70% dos pacientes com câncer de pulmão (WHO, 2015). Apesar do fator genético exercer um papel importante na oncogênese do câncer, a sua contribuição como um fator de risco é menos expressiva, sendo relacionado a alguns tipos de tumor como o retinoblastoma, câncer de mama, estômago e intestino, onde casos familiares são relatados (INCA, 2014).

Alguns tipos de câncer como mama, cervical, oral e colorretal são de fácil tratamento e apresentam altas taxas de cura quando diagnosticados precocemente (WHO, 2015). No entanto, quando detectados em estágios mais

avançados as chances de cura se tornam menores e os tratamentos, como cirurgia, e/ou radioterapia, e/ou quimioterapia, são muitas vezes tóxicos para os pacientes e de alto custo para os planos de saúde. Desta forma, a busca pela prevenção primária, investimentos no diagnóstico precoce e a descoberta de novos e específicos alvos terapêuticos são a fórmula para a redução da incidência e mortalidade dessa doença (Edwards *et al.*, 2014).

É na tentativa de encontrar novos e específicos alvos terapêuticos que muitos pesquisadores estudam à gênese do processo neoplásico. Neste, constata-se que alterações em processos intrínsecos como proliferação, diferenciação, morte celular programada e capacidade de controle do micro ambiente, são características que levam ao sucesso do câncer em detrimento do organismo saudável. Desta forma, a análise da proliferação celular e dos eventos relacionados à apoptose, são ferramentas importantes para conhecer o comportamento das células tumorais (Wang *et al.*, 2004a).

É nesse contexto que se insere o estudo do sistema purinérgico, visto que a sua sinalização está intimamente relacionada com o controle de processos como o crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular (Burnstock & Di Virgilio, 2013). Ainda, estudos têm demonstrado a presença de altos níveis de ATP e adenosina no microambiente tumoral em comparação com os tecidos saudáveis (Ohta *et al.*, 2006; Pellegatti *et al.*, 2008), sugerindo um papel desses compostos na gênese e manutenção do tumor (Martin *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2001). Considerando a complexidade da sinalização purinérgica, a ação final sobre o tumor irá depender do painel de expressão e ativação dos receptores P1 e P2 no tecido, bem como dos níveis de ATP/adenosina no microambiente, que em conjunto irão produzir uma resposta final que pode ser tanto a indução da proliferação, da morte (apoptose/necrose/autofagia) ou da diferenciação celular (Feng *et al.*, 2014).

Vários estudos tem demonstrado o efeito anti-tumoral dos nucleotídeos de adenina no câncer, dentre eles podemos citar: câncer de cólon e reto (Hoepfner *et al.*, 1999), leucemia (Seetulsingh-Goorah *et al.*, 1998), câncer de esôfago (Maaser *et al.*, 2002), células de tumor de Erlich (Dubyak & De Young, 1985), células de câncer de pele escamoso (Greig *et al.*, 2003), câncer de pulmão (Schafer *et al.*, 2003), câncer cervical (Wang *et al.*, 2004a), células H35

de hepatoma (Horstman *et al.*, 1986), câncer de próstata (Shabbir *et al.*, 2008a), câncer de bexiga (Shabbir *et al.*, 2008b), retinoblastoma (Kim *et al.*, 2011), neuroblastoma (Gómez-Villafuertes *et al.*, 2009), glioma (Suplat-Wypych *et al.*, 2010) e melanoma (White *et al.*, 2005b; White *et al.*, 2009). Diferentes receptores purinérgicos P2 podem estar envolvidos neste efeito citotóxico (P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>11</sub>) (White & Burnstock, 2006), sendo que a resposta final será diferente de acordo com o tipo celular e os níveis de ATP extracelular (Burnstock & Di Virgilio, 2013).

Assim como o ATP, a adenosina extracelular também parece ter um efeito citotóxico dependendo do tipo tumoral estudado e do receptor purinérgico P1 envolvido. Dentre eles, podemos citar o papel dos receptores A<sub>2A</sub> em células de câncer de cólon (Caco-2) e de hepatoma (HepG2) (Yasuda *et al.*, 2009), mieloma múltiplo e linfoma (Rickles *et al.*, 2012), A<sub>1</sub> em células de câncer de cólon (CW2) (Saito *et al.*, 2010) e glioblastoma (Synowitz *et al.*, 2006) e A<sub>3</sub> em linfoma, melanoma, próstata, pulmão, colon, células de câncer neural e células de carcinoma hepatocelular (HCC) (Fishman *et al.*, 2000; Bar-Yehuda *et al.*, 2001; Fishman *et al.*, 2002; Merighi *et al.*, 2002; Madi *et al.*, 2003; Fishman *et al.*, 2004; Bar-Yehuda *et al.*, 2008; Aghaei *et al.*, 2011; Aghaei *et al.*, 2012; Otsuki *et al.*, 2012; Vincenzi *et al.*, 2012;). Além de atuar via receptores P1, a adenosina também pode induzir apoptose via recaptção celular através de transportadores específicos de membrana, como foi o caso descrito para as linhagens de câncer de mama (MCF-7) (Tsuchiya *et al.*, 2012), astrocitoma (RCR1) (Sai *et al.*, 2006), mesotelioma (Nogi *et al.*, 2012), hepatocarcinoma (Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011) e câncer gástrico (GT3-TKB) (Saitoh *et al.*, 2004).

Diferente dos estudos encontrados na literatura, na primeira parte deste trabalho nós mostramos que o efeito citotóxico do ATP extracelular em linhagens celulares humanas de câncer cervical é na verdade mediado pela recaptção da adenosina formada a partir do seu metabolismo e não pela sua ação direta via receptores P2. Isso contrasta com o já descrito mecanismo de indução de apoptose do ATP via ativação do receptor P2X<sub>7</sub> em células humanas epiteliais cervicais (Wang *et al.*, 2004a). De acordo com este estudo, células epiteliais normais da ectocérvice (hECE) entram em processo de

apoptose após serem expostas a 50  $\mu$ M de ATP e BzATP, e esse processo é desencadeado exclusivamente pela ativação do receptor P2X7 com conseqüente influxo de cálcio, aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  e ativação da caspase-9. Ainda, diferente do que foi descrito em nosso trabalho, o tratamento das células epiteliais com ADP ou adenosina não produziu efeito na indução da morte celular, reforçando o papel exclusivo do ATP via receptor P2X7. Considerando-se a concentração dos nucleotídeos utilizada nesse estudo, podemos sugerir que as células epiteliais cervicais são mais susceptíveis ao efeito citotóxico do ATP e BzATP, quando comparado aos resultados obtidos por nós com células de câncer cervical, que necessitaram a concentração de 5mM de ATP para sofrerem um efeito na redução da viabilidade celular. Sendo assim, podemos inferir que as células de câncer cervical desenvolveram um mecanismo de resistência ao efeito citotóxico do ATP ao longo do processo de transformação maligna.

Em concordância com essa suposição, nossos dados mostram que a linhagem de câncer cervical SiHa apresenta uma heterogeneidade com relação a expressão do receptor P2X7. De acordo com o nosso trabalho, as células podem ser subdivididas em duas populações, uma menor subpopulação composta por células que expressam altos níveis do receptor P2X7 e portanto são mortas pela ação do ATP extracelular; e uma maior subpopulação que apresenta baixos níveis do receptor P2X7 e portanto sofre a ação citotóxica da recaptação da adenosina. Essa redução da expressão/funcionalidade do receptor P2X7 como uma forma de escape das células tumorais a apoptose já vem sendo estudada e demonstrada por alguns autores (Huang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2009). Li e colaboradores (Li *et al.*, 2009) reportaram que células tumorais provenientes da ectocérvice (escamosas), endocérvice, endométrio (adenocarcinoma), bexiga (células transicionais) e mama (adenocarcinoma ductal e lobular) apresentavam menores níveis do receptor P2X7 quando comparadas ao tecido normal adjacente. E mais, os níveis do receptor P2X7 já apresentavam-se reduzidos nas células displásicas da ectocérvice e também nas células pré-cancerígenas do endométrio e da bexiga, indicando que uma redução da expressão do receptor P2X7 pode preceder ou coincidir com o desenvolvimento neoplásico dos tecidos estudados.

Ainda com relação a redução na funcionalidade do receptor P2X7, um estudo realizado por Feng e colaboradores (Feng *et al.* 2006b), identificou a presença de uma variante truncada do receptor (P2X7-j) que é expressa endogenamente pelas células de cancer cervical (HT3, HeLa, SiHa e Caski) e é desprovida da região carboxi-terminal sendo portanto incapaz de formar poros e induzir apoptose. Além de ser inativo, P2X7-j também interage com o receptor *full-length* inibindo a sua ativação. De acordo com os autores, a interação entre as duas formas do receptor P2X7 representa um mecanismo de resistência celular à apoptose desenvolvido pelas células de câncer cervical. Apesar da linhagem celular SiHa expressar essa variante truncada (em baixos níveis), resultados obtidos pelo nosso grupo demonstram que o receptor P2X7 *full-length* é funcional, visto a sua capacidade de indução de apoptose após estímulo pelo BzATP.

Entretanto, o papel do receptor P2X7 na indução da morte celular na linhagem SiHa é pequeno, considerando que o bloqueio da sua ativação pelo uso do antagonista oATP e do seu *knockdown* reduziram a taxa de citotoxicidade do ATP em apenas 20%. Diferentemente, nós observamos que o bloqueio da recaptação da adenosina pelo tratamento com dipiradamol, impediu significativamente a redução da viabilidade celular, sugerindo que a citotoxicidade do ATP não está relacionada ao seu efeito *per se*, mas sim pela ação do seu metabólito adenosina. Muitos estudos descrevem a via de sinalização intrínseca como um dos mecanismos de indução de apoptose pela adenosina (Barry & Lind, 2000; Schrier *et al.*, 2001; Saitoh *et al.*, 2004; Sai *et al.*, 2006; Tsuchiya *et al.*, 2012). Nesta via a adenosina extracelular é recaptada para o interior das células via os transportadores de membrana e é transformada em AMP pela ação da adenosina kinase, culminando na redução da razão ATP/AMP intracelular com consequente ativação da AMPK e indução de apoptose. O desfecho intracelular na indução de apoptose varia de acordo com o tipo celular estudado e pode ser tanto independente quanto dependente de caspase. No caso da SiHa, a indução de apoptose é independente da caspase e envolve o acúmulo de dATP, o aumento da p53 e ativação da autofagia.

O exato mecanismo pelo qual a entrada de adenosina na célula gera o acúmulo de dATP não foi totalmente esclarecido, mas podemos sugerir que o desequilíbrio causado nos níveis intracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos possa estar relacionado. Além disso, já se tem descrito na literatura que o aumento de dATP intracelular está associado ao acúmulo de rupturas nos filamentos de DNA e ativação da proteína p53 pró-apoptótica (Joachims *et al.*, 2008; Johnston, 2011), o que corrobora com os nossos dados. Ainda, Nogi e colaboradores (Nogy *et al.* 2012) também demonstraram, em células de mesotelioma, que a recaptação celular de adenosina e a sua transformação a AMP induz aumento da p53 e leva as células à apoptose de uma forma independente de caspase.

A indução de apoptose, independente ou dependente de caspase, consiste no principal mecanismo de promoção de morte celular entre os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer atualmente. No entanto, a maioria das células tumorais apresentam ou passam a adquirir resistência a esses agentes pró-apoptóticos. Desta forma, a busca por novos compostos que possam promover simultaneamente múltiplos mecanismos indução de morte celular, como apoptose, necrose e autofagia serão a nova fórmula para atingir a máxima eficácia no tratamento do câncer com o mínimo de efeitos adversos (Galluzzi *et al.*, 2011).

No nosso trabalho, nós demonstramos pela primeira vez um dado bastante relevante sobre o papel da autofagia no contexto da indução de morte celular pela recaptação da adenosina. A autofagia é um processo celular fisiológico que leva a degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas celulares danificadas a fim de manter a homeostase celular em condições adversas, como privação de nutrientes, presença de patógenos e toxinas (Filippi-Chiela *et al.*, 2011). Dependendo do seu grau de ativação a autofagia pode contribuir para a sobrevivência e adaptação celular ou pode levar à morte celular (morte autofágica ou morte celular programada tipo II) (He and Klionsky, 2009; Yang and Klionsky, 2010). A indução da autofagia pode ser monitorada pela expressão de duas proteínas envolvidas nesse processo a LC3 e a p62. A proteína LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos) é uma proteína citosólica (LC3 na forma I-LC3-I) que é clivada na região C-

terminal quando sofre um estímulo pró-autofágico, sendo convertida à forma II (LC3-II). Já a proteína p62 marca os componentes celulares que devem ser degradados pelo autofagossomo, sendo portanto reduzida com o estímulo autofágico (Pankiv *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2011). De acordo com o nossos resultados, a indução da autofagia pode ser vista após 48h e 72h de exposição ao ATP 5mM, representado pelo aumento da razão LC3II/I e a diminuição da quantidade de p62. Ainda, esse efeito foi completamente bloqueado pelo pré-tratamento com dipiridamol, reforçando o papel da recaptção da adenosina na indução desse processo. Mais, a avaliação das células marcadas com o laranja de acridina (AO), que indica a formação de autofagolisossomo, mostra que o aumento das células marcadas pelo AO está correlacionado positivamente com o aumento da morte celular, sugerindo a indução da morte autofágica.

O papel da autofagia no desenvolvimento tumoral vem sendo questão de grande interesse nos últimos tempos. Sua ativação parece ter um papel duplo na oncogênese, sendo tanto um fator importante para a indução de morte celular quanto para a progressão tumoral (Baehrecke, 2005; Hippert *et al.*, 2006; Galluzzi *et al.*, 2008; Eskelinen, 2011). Recentemente, Li e colaboradores (Li *et al.*, 2015), apontaram o processo de autofagia como um fator determinante no desenvolvimento do câncer cervical. De acordo com os autores, o vírus HPV promove a carcinogênese por meio da inibição da autofagia na célula hospedeira. Segundo eles, num primeiro momento, quando as células são infectadas pelo vírus, o processo de autofagia é ativado, resultando em morte autofágica com a finalidade de eliminar o invasor e impedir novas infecções. Mas posteriormente, o HPV passa a reprimir a autofagia, bloqueando dessa forma a defesa celular contra o vírus que passa então a proliferar e infectar novas células, culminando na progressão do câncer cervical. Sendo assim, encontrar uma maneira de induzir autofagia, como o uso da adenosina por exemplo, pode ser uma nova estratégia para silenciar o vírus do HPV e prevenir o desenvolvimento do câncer cervical.

Além do uso da adenosina, outras ferramentas também podem ser utilizadas com a finalidade de aumentar a morte celular e prevenir a progressão tumoral. Na segunda parte desse trabalho, utilizando linhagens de câncer de

cólon (MCA38), nós demonstramos que o *heat shock* pode ser utilizado como um novo método para aumentar a sensibilidade do receptor P2X7 ao ATP, ampliando dessa forma a capacidade de indução de morte celular por esse composto. O mecanismo envolvido nesse aumento da funcionalidade do receptor P2X7 parece estar associado a processos de reorganização dos domínios ricos em colesterol da membrana plasmática gerados pelo stress do aquecimento celular.

São grandes os indícios relacionando a resposta celular ao *heat shock* à mudanças na composição e arquitetura das membranas. Na verdade, acredita-se na hipótese de que a membrana plasmática atue como um sensor na interface celular, detectando o sinal de *heat shock* e o transmitindo para o interior da célula (Vigh *et al.*, 1998). Alguns pesquisadores propõem que, apesar da mudança do estado físico das membranas *per se*, o aparecimento de microdomínios específicos ou mudanças na composição dos lipídios bem como da interação lipídio-proteína das membranas são potencialmente e igualmente capazes de gerar um estímulo para o interior da célula (Horvath *et al.*, 1998; Vigh & Maresca, 2002). Sendo assim, a mudança na estrutura da membrana plasmática causada pelo *heat shock* pode interferir com a atividade de várias moléculas ali presentes, dentre elas os receptores de membrana (Vigh *et al.*, 2005). No caso do receptor P2X7, essa hipótese é apoiada pelo fato de que o agente fluidizador de membrana, benzil álcool (BA), também foi capaz de produzir os mesmos efeitos que o *heat shock*, mas a 37°C. De acordo com Nagy e colaboradores (Nagy *et al.*, 2007), o composto BA atua similarmente como o *heat shock* promovendo uma reorganização dos domínios ricos em colesterol da membrana.

Considerando essa informação, nós avaliamos o papel destes domínios ricos em colesterol de membrana, conhecidos como rafts, no contexto da hiperativação do receptor P2X7 causado pelo BA ou *heat shock*. De acordo com os nossos dados de imunofluorescência e imunoprecipitação, o receptor P2X7 não parece estar interagindo com os rafts planares e as cavéolas. Ainda, quando submetidos ao efeito do *heat shock* ou BA mais o ATP, ambos os rafts de membrana apresentaram uma alteração no seu perfil de distribuição, que não foi vista para o receptor P2X7. Somado a isso, o uso de agentes

depletors de colesterol (MCD e filipinas) ou a adição de colesterol solúvel  membrana plasmática não inibiram o efeito observado sobre o receptor. Esses dados sugerem que o P2X7 não encontra-se associado e não precisa interagir com os rafts lipídicos de membrana nas células MCA38 para exercer a sua função citolítica. Diferentemente, Robinson e colaboradores (Robinson *et al.*, 2014) mostraram que, em células humanas (embrinicas de rim) e macrgafos isolados de camundongos, o colesterol apresenta um papel regulador da ativação e sensibilização do receptor P2X7. De acordo com os autores, o uso do agente depletor de colesterol MCD, leva a um aumento significativo da formação do poro do receptor; já a adição de colesterol solúvel  membrana plasmática gera um efeito oposto. Essas discordâncias podem ser explicadas pelas diferença na distribuico/expressão do receptor P2X7 entre as células estudadas (normais x cancerígena).

Recentemente, Bian e colaboradores (Bian *et al.* 2013) descreveram uma nova via de sinalização intracelular envolvida na inibição da proliferação celular das linhagens de câncer de cólon (MCA38) e melanoma (B16/F10). De acordo com os autores, o estímulo do receptor P2X7 por altos níveis de ATP leva a ativação de duas vias, a conhecida PI3K/AKT e a nova AMPK-PRAS40-mTOR, que atuam de forma independente e sinérgica para promover a morte celular através do equilíbrio entre crescimento celular e indução de autofagia. Em concordância com esse estudo, no nosso trabalho a exposição das células MCA38  altos níveis de ATP em conjunto com o *heat shock* ou BA induziu via P2X7 a ativação das mesmas vias de sinalização, culminando em morte celular. Ainda, a formação do poro de membrana associado com a citotoxicidade do ATP não depende da interação com os canais do tipo conexina/panexina, sugerindo ser uma propriedade exclusiva do receptor P2X7.

Apesar de ser um canal iônico, o receptor P2X7 parece interagir com 11 diferentes proteínas formando um complexo protéico capaz de gerar uma sinalização intracelular (Kim *et al.*, 2001). Dentre essas proteínas, três *heat shock proteins* (HSP) foram encontradas: HSP90, HSP70 e HSC71. O verdadeiro papel dessas HSP na ativação do receptor P2X7 ainda não foi totalmente esclarecido, mas segundo Adinolfi e colaboradores (Adinolfi *et al.*

2003), a HSP90 parece ter um efeito regulador sobre a ativação do receptor P2X7. Quando apresenta-se fosforilada na tirosina, a HSP90 atua inibindo a formação e a funcionalidade do complexo P2X7. Desta forma, o bloqueio dessa fosforilação poderia ser uma nova estratégia para aumentar a ativação do receptor. No entanto, o uso de geldanamicina (GDA), um inibidor da HSP90 e da sua fosforilação, apresentou um efeito citotóxico *per se* e independente do receptor P2X7 quando colocado em contato com as células MCA38 do nosso estudo. Estes dados mostram que GDA exerce um efeito particular na indução da morte celular, o que já se foi demonstrado em vários tipos de câncer (Trepel *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015; Grzanka *et al.*, 2015). Ainda, nas células MCA38 o receptor P2X7 não parece estar interagindo com a HSP90 e HSP70. E, apesar de o *heat shock* normalmente induzir o aumento dos níveis das HSP intracelulares, no nosso estudo, a temperatura de 40°C pelo curto período de tempo (20min) não foi suficiente para causar esse efeito. Na verdade, Nagy e colaboradores (Nagy *et al.* 2007) mostraram que um aumento nos níveis protéicos da HSP70 só foram encontrados quando células de melanoma B16/F10 foram expostas no mínimo a 41°C por 1h. Desta forma, em nosso estudo, o aumento da ativação do receptor P2X7 após o *heat shock* não parece estar relacionado com a ação das *heat shock proteins*.

O uso da hipertermia como um método de tratamento individual ou em combinação com terapias tradicionais, como a quimioterapia, cirurgia e radioterapia vem sendo empregado por muitos pesquisadores com o intuito de potencializar o combate ao câncer (Luk *et al.*, 1984; Irish *et al.*, 1986; Seegenschmiedt *et al.*, 1993). Esta combinação baseia-se no fato de que em regiões tumorais com baixa perfusão, onde o aporte de oxigênio e de nutrientes é escasso, as células cancerígenas são normalmente resistentes ao efeito da quimioterapia e radioterapia, mas por outro lado, são extremamente termossensíveis (Chatterjee *et al.*, 2011). Sendo assim, quando usados em associação a eficiência do tratamento pode ser aumentada. Vários estudos clínicos e pré-clínicos avaliando a combinação da hipertermia com a quimioterapia ou a radioterapia estão sendo realizados em câncer de próstata (Van Den Berg *et al.*, 2006; Hurwitz *et al.*, 2011), mama (Moros *et al.*, 2010; Zagar *et al.*, 2010), cérvix (Vasanthan *et al.*, 2005; Franckena & Van Der Zee,

2010) e cabeça e pescoço (Huilgol *et al.*, 2010a; Huilgol *et al.*, 2010b). Resultados preliminares mostram que a adição da hipertermia não aumenta a toxicidade das terapias tradicionais, mas contribui para a estabilização e a cura do câncer e/ou auxilia no tratamento paliativo. No presente trabalho, nós demonstramos pela primeira vez que a hipertermia pode ser utilizada para aumentar a citotoxicidade do ATP extracelular por meio do incremento exclusivo da ativação do receptor P2X7. Considerando-se o contexto do microambiente tumoral, onde altos níveis de ATP extracelular são encontrados (Pellegatti *et al.*, 2008), o uso da hipertermia aumentaria a eficiência terapêutica e possivelmente ajudaria a superar a resistência celular aos tratamentos tradicionais.

Em conclusão, o nosso trabalho fornece evidências adicionais sobre o papel da sinalização purinérgica no contexto da biologia celular tumoral. Ainda, propomos que futuramente o uso de medicamentos à base de purinas possam ser associados à hipertermia como agentes adjuvantes na terapia do câncer. Entretanto, maiores estudos devem ser realizados para comprovação e indicação desta abordagem terapêutica.



## **V. Conclusões Gerais**

---



Os resultados apresentados nesta tese permitem as seguintes conclusões:

1. O efeito citotóxico do ATP, bem como o papel do receptor P2X7 nesse processo varia de acordo com o tipo de célula tumoral estudada.
2. Em linhagens de câncer cervical, a adenosina formada pelo metabolismo do ATP é o principal agente causador de morte celular. Nesse contexto, o papel do receptor P2X7 parece ser apenas co-adjuvante, visto que o seu silenciamento ou o seu bloqueio reduziram apenas 20% o efeito citotóxico do ATP.
3. Ainda, de acordo com os níveis de expressão do receptor P2X7 as células de câncer cervical parecem responder de forma diferente ao efeito citotóxico do ATP. Células com altos níveis de expressão do receptor parecem morrer via sua ativação pelo ATP, em contrapartida, células com baixa expressão de P2X7 sofrem o efeito citotóxico da recaptação da adenosina.
4. A recaptação da adenosina gera um desequilíbrio nos níveis dos nucleotídeos intracelulares, culminando na ativação da AMPK e da p53 e na indução de autofagia.
5. Em linhagens de câncer de cólon MCA38 o ATP extracelular exerce efeito citotóxico por meio da ativação exclusiva do receptor P2X7, culminando na inibição da via AKT/PRAS40/mTOR.
6. Esse efeito citotóxico pode ser potencializado pela ação do *heat shock*, que parece aumentar a funcionalidade do receptor P2X7 via reorganização na composição e arquitetura da membrana celular.
7. O uso de medicamentos à base de purinas associados à hipertermia podem ser sugeridos como agentes adjuvantes na terapia do câncer.

Mas maiores estudos devem ser realizados para comprovação e indicação desta abordagem terapêutica.

8. O receptor P2X7 poderá ser um potencial alvo molecular no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer, mas o seu verdadeiro papel no desenvolvimento tumoral ainda precisa ser elucidado.

## **VI. Perspectivas**

---



No sentido de aprofundar o papel do receptor P2X7 no desenvolvimento/resistência tumoral e avaliar o potencial terapêutico do uso dos nucleotídeos/nucleosídeos de adenina em associação com a hipertermia como uma forma de aumentar a ativação do receptor P2X7 no microambiente tumoral, algumas perspectivas são sugeridas:

1. Comparar a resistência à quimioterapia, capacidade de proliferação, e marcadores da angiogênese, entre a linhagens de câncer cervical SiHa silenciada e não silenciada para o gene do receptor P2X7, por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*;
2. Descobrir o exato mecanismo pelo qual o *heat shock* está levando a ativação do receptor P2X7 na linhagem MCA38;
3. Avaliar o efeito do *heat shock* na ativação do receptor P2X7 em outras linhagens celulares, como as de câncer cervical;
4. Realizar estudos *in vivo*, avaliando o efeito local da hipertermia no tratamento de tumores malignos implantados em associação com radioterapia e/ou quimioterapia.



## **VII. Referências**



- ADINOLFI, E.; KIM, M.; YOUNG, M. T.; DI VIRGILIO, F.; SURPRENANT A. tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors. *The journal of biological chemistry*, v.278, p.37344-51, 2003.
- ADINOLFI, E.; CALLEGARI, M. G.; FERRARI, D.; BOLOGNESI, C.; MINELLI, M.; WIECKOWSKI, M. R.; PINTON, P.; RIZZUTO, R.; DI VIRGILIO, F. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Molecular Biology of the Cell*, v.16, p.3260–3272, 2005.
- ADINOLFI, E.; RAFFAGHELLO, L.; GIULIANI, A. L.; CAVAZZINI, L.; CAPECE, M.; CHIOZZI, P.; BIANCHI, G.; KROEMER, G.; PISTOIA, V.; DI VIRGILIO, F. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Research*, v.72, p.2957–2969, 2012.
- AGHAEI, M.; KARAMI-TEHRANI, F.; PANJEHPOUR, M.; SALAMI, S.; FALLAHIAN F. Adenosine induces cell-cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines, LNCap-FGC-10, DU-145, and PC3. *The Prostate*, v.72, p.361-75, 2012.
- AGHAEI, M.; PANJEHPOUR, M.; KARAMI-TEHRANI, F.; SALAMI, S. Molecular mechanisms of A3 adenosine receptor-induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and independent prostate cancer cell lines: involvement of intrinsic pathway. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v.137, p.1511-23, 2011.
- AGTERESCH, H. J.; DAGNELIE, P. C.; VAN DER GAAST, A.; STIJNEN, T.; WILSON, J. H. Randomized clinical trial of adenosine 50-triphosphate in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v.92, p.321–8, 2000.
- ANTONIOLLI, L.; BLANDIZZI, C.; PACHER, P.; HASKO, G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature Reviews. Cancer*, v.13, n.12, p.842-57, 2013.
- BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual roles in life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v.6, p.505-10, 2005.
- BARRY, C. P.; LIND, S. E. Adenosine-mediated killing of cultured epithelial cancer cells. *Cancer Research*, v.60, p.1887–94, 2000.
- BAR-YEHUDA, S.; BARER, F.; VOLFSSON, L.; FISHMAN, P. Resistance of muscle to tumor metastases: a role for a3 adenosine receptor agonists. *Neoplasia*, v.3, p.125-31, 2001.
- BAR-YEHUDA, S.; STEMMER, S. M.; MADI, L.; CASTEL, D.; OCHAION, A.; COHEN, S.; BARER, F.; ZABUTTI, A.; PEREZ-LIZ, G.; DEL VALLE, L.; FISHMAN, P. The A3 adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF-kappaB signal transduction pathways. *International Journal of Oncology*, v.33, p.287-95, 2008.

- BEIJER, S.; HUPPERETS, P. S.; VAN DEN BORNE, B. E.; EUSSEN, S. R.; VAN HENTEN, A. M.; VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, M.; DE GRAEFF, A.; AMBERGEN, T. A.; VAN DEN BRANDT, P. A.; DANGNELIE, P. C. Effect of adenosine 50-triphosphate infusions on the nutritional status and survival of preterminal cancer patients. *Anti-cancer Drugs*, v.20, p.625–33, 2009.
- BIAN, S.; SUN, X.; BAI, A.; ZHANG, C.; LI, L.; ENJYOJI, K.; JUNGER, W. G.; ROBSON, S. C.; WU, Y. P2X7 integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-mTOR signaling pathways to mediate tumor cell death. *PLoS One*, v.; 8, p.e60184, 2013.
- BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signalling*, v.9, p.491-540, 2013.
- CALVERT, R. C.; SHABBIR, M.; THOMPSON, C. S.; MIKHAILIDIS, D. P.; MORGAN, R. J.; BURNSTOCK, G. Immunocytochemical and pharmacological characterisation of P2-purinoreceptor-mediated cell growth and death in PC-3 hormone refractory prostate cancer cells. *Anticancer Research*, v.24, p.2853-9, 2004.
- CASAS-PRUNEDA, G.; REYES, J. P.; PEREZ-FLORES, G.; PEREZ-CORNEJO, P.; ARREOLA, J. Functional interactions between P2X4 and P2X7 receptors from mouse salivary epithelia. *The Journal of Physiology*, v.587, p.2887–2901, 2009.
- CHATTERJEE, D. K.; DIAGARADJANE, P.; KRISHNAN, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Therapeutic Delivery*, v. 2, p.1001-14, 2011.
- CHEN, Y.; CORRIDEN, R.; INOUE, Y.; YIP, L.; HASHIGUCHI, N.; ZINKERNAGEL, A. NIZET, V.; INSEL, P. A.; JUNGER, W. G. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, v.314, p.1792–1795, 2006.
- CORRIDEN, R.; CHEN, Y.; INOUE, Y.; BELDI, G.; ROBSON, S. C.; INSEL, P. A.; JUNGER, W. G. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. *The Journal of Biological Chemistry*, v.283, p.28480–28486, 2008.
- COUTINHO-SILVA, R.; STAHL, L.; CHEUNG, K. K.; DE CAMPOS, N. E.; DE OLIVEIRA SOUZA, C.; OJCIUS, D. M.; BURNSTOCK, G. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, n.288, p.G1024-35, 2005.
- DELI, T.; CSERNOCH, L. Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors. *Pathology Oncology Research*, v.14, p.219-31, 2008.
- DEAGLIO, S.; ROBSON, S. C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Advances in pharmacology*, v.61, p.301-32, 2011.
- DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends in Pharmacological Science*, v.28, p465–472, 2007.

- DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptor, and Cancer. *Cancer Research*, v. 72, p.5441-5447, 2012.
- DI VIRGILIO, F.; FERRARI, D.; ADINOLFI, E. P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signalling*, v.5, p.251–256, 2009.
- DIXON, C. J.; BOWLER, W. B.; FLEETWOOD, P.; GINTY, A. F.; GALLAGHER, J. A. Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P2-purinceptors. *British Journal of Cancer*, v.75, n.1, p.34-9, 1997.
- DUBYAK, G. R.; DE YOUNG, M. B. Intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich ascites tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v.260, p.10653–10661, 1985.
- EDWARDS, B. K.; NOONE, A. M.; MARIOTTO, A. B.; SIMARD, E.P.; BOSCOE, F. P.; HENLEY, S. J.; JEMAL, A.; CHO, H.; ANDERSON, R. N.; KOHLER, B. A.; EHEMAN, C. R.; WARD, E. M.; Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer*, v.120, p.1290-314, 2014.
- ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. *The New England Journal of Medicine*, v.367, p.2322-33, 2012.
- ESKELINEN, E. L.; SCHMIDT, C. K.; NEU, S.; WILLENBORG, M.; FUERTES, G.; SALVADOR, N.; TANAKA, Y.; LULLMANN-RAUCH, R.; HARTMANN, D.; HEEREN, J.; VON FIGURA, K.; KNECHT, E.; SAFTIG, P. Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-deficient Fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, v.15, p.3132-3145, 2004.
- ESKELINEN, E. L. The dual role of autophagy in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, v.11, p.294-300, 2011.
- FANG, W. G.; PIRNIA, F.; BANG, Y. J.; MYERS, C. E.; TREPEL, J. B. P2-purinergic receptor agonists inhibit the growth of androgen-independent prostate carcinoma cells. *The Journal of Clinical Investigation*, v.89, p.191-6, 1992.
- FENG, L.; SUN, X.; CSIZMADIA, E.; HAN, L.; BIAN, S.; MURAKAMI, T.; WANG, X.; ROBSON, S. C.; WU, Y. Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. *Neoplasia*, v.13, p.206-16, 2011.
- FENG, L.; TAPPER, E. B.; SUN, X.; GEHRING, M.; ROBSON, S. C.; WU, Y. Purinergic Modulation and CD39/ENTPD1 in Cancer. *Frontiers in Anti-Cancer Drug Discovery*, Chapter 5, v.4, p.229-292, 2014.
- FENG, Y. H.; LI, X.; ZENG, R.; GORODESKI, G. I. Endogenously expressed truncated P2X7 receptor lacking the C-terminus is preferentially upregulated in epithelial cancer cells and fails to mediate ligand-induced pore formation and apoptosis. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, v.25, p.1271–1276, 2006a.

- FENG, Y. H.; LI, X.; WANG, L.; ZHOU, L.; GORODESKI, G. I. A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*, v.281, p.17228–17237, 2006b.
- FILIPPI-CHIELA, E. C.; VILLODRE, E. S.; ZAMIN, L. L.; LENZ, G. Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells. *Plos One*, v.6, p.e20849, 2011.
- FERRARI, D.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; DAL SUSINO, M.; MELCHIORRI, L.; BARICORDI, O. R.; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *Journal of Immunology*, v.159, p.1451–1458, 1997.
- FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; OHANA, G.; BARER, F.; OCHAION, A.; ERLANGER, A.; MADI, L. An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B. *Oncogene*, v.23, p.2465-71, 2004.
- FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; OHANA, G.; PATHAK, S.; WASSERMAN, L.; BARER, F.; MULTANI, A. S. Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A3 adenosine receptor. *European Journal of Cancer*, v.36, p.1452-8, 2000.
- FISHMAN, P.; MADI, L.; BAR-YEHUDA, S.; BARER, F.; DEL VALLE, L.; KHALILI, K. Evidence for involvement of Wnt signaling pathway in IB-MECA mediated suppression of melanoma cells. *Oncogene*, v. 21, p.4060-4, 2002.
- FRANCKENA, M.; VAN DER ZEE, J. Use of combined radiation and hyperthermia for gynecological cancer. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, v. 22, p.9–14, 2010.
- FU, W.; MCCORMICK, T.; QI, X.; LUO, L.; ZHOU, L.; LI, X.; WANG, B. C.; GIBBONS, H. E.; ABDUL-KARIM, F. W.; GORODESKI, G. I. Activation of P2X(7)-mediated apoptosis inhibits DMBA/TPA-induced formation of skin papillomas and cancer in mice. *BMC Cancer*, v.9, p.114, 2009.
- GALLUZZI, L.; VICENCIO, J. M.; KEPP, O.; TASDEMIR, E.; MAIURI, M. C.; KROEMER, G. To die or not to die: that is the autophagic question. *Current Molecular Medicine*, v.8, p.78-91, 2008.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; VACCHELLI, E.; KROEMER, G. Cell death signaling and anticancer therapy. *Frontiers in Oncology*, v.1, article 5, 2011.
- GARCIA-MARCOS, M.; POCHET, S.; MARINO, A.; DEHAYE, J. P. P2X7 and phospholipid signalling: the search of the “missing link” in epithelial cells. *Cellular Signalling*, v.18, p.2098–2104, 2006.
- GARTLAND, A.; BUCKLEY, K. A.; HIPSKIND, R. A.; BOWLER, W. B.; GALLAGHER, J. A. P2 receptors in bone-modulation of osteoclast formation and activity via P2X7 activation. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v.13, p.237–242, 2003.

- GARTLAND, A.; HIPSKIND, R. A.; GALLAGHER, J. A.; BOWLER, W. B. Expression of a P2X7 receptor by a subpopulation of human osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.16, p.846–856, 2001.
- GARTLAND, A.; ORRISS, I. R.; RUMNEY, R. M.; BOND, A. P.; ARNETT, T.; GALLAGHER, J. A. Purinergic signalling in osteoblasts. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, v.17, p.16–29, 2012.
- GEHRING, M. P.; PEREIRA, T. C.; ZANIN, R. F.; BORGES, M. C.; BRAGA FILHO, A.; BATTASTINI, A. M.; BOGO, M. R.; LENZ, G.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B. P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic Signalling*, v.8, p.729-39, 2012.
- GHIRINGHELLI, F.; APETOH, L.; TESNIERE, A.; AYMERIC, L.; MA, Y.; ORTIZ, C.; VERMAELEN, K.; MIGNOT, G.; ULLRICH, E.; PERFETTINI, J. L.; SCHLEMMER, F.; TASDEMIR, E.; UHL, M.; GENIN, P.; CIVAS, A.; RYFFEL, B.; KANELLOPOULOS, J.; TSCHOPP, J.; ANDRE, F.; LIDEREAU, R.; MCLAUGHLIN, N. M.; HAYNES, N. M.; SMYTH, M. J.; KROEMER, G.; ZITVOGEL, L. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine*, v.15, p.1170–8, 2009.
- GLOBOCAN 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> > Acesso em: 06 out. 2015.
- GREIG, A. V.; LINGE, C.; HEALY, V.; LIM, P.; CLAYTON, E.; RUSTIN, M. H.; MCGROUTHER, D. A.; BURNSTOCK, G. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, v.121, n.2, p.315-27, 2003.
- GRZANKA, D.; KOWALCZYK, A. E.; IZDEBSKA, M.; KLIMASZEWSKA-WISNIEWSKA, A.; GAGAT, M. The interactions between SATB1 and F-actin are important for mechanisms of active cell death. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v.53, p.152-61.
- GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; DEL PUERTO, A.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; BUSTILLO, D.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, J. I.; HUERTA, P. G.; ARTALEJO, A. R.; GARRIDO, J. J.; MIRAS-PORTUGAL, M. T. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neurite outgrowth in neuroblastoma cells. *The FEBS Journal*, v.276, p.5307–5325, 2009.
- HASKO, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v.7, p.759-770, 2008.
- HATTORI, F.; OHSHIMA, Y.; SEKI, S.; TSUKIMOTO, M.; SATO, M.; TAKENOUCHI, T.; SUZUKI, A.; TAKAI, E.; KITANI, H.; HARADA, H.; KOJIMA, S. Feasibility study of B16 melanoma therapy using oxidized ATP to target purinergic receptor P2X7. *European Journal of Pharmacology*, v.695, p.20–26, 2012.

- HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, v.43, p.67–93, 2009.
- HILLMAN, K. A.; JOHNSON, T. M.; WINYARD, P. J.; BURNSTOCK, G.; UNWIN, R. J.; WOOLF, A. S. P2X(7) receptors are expressed during mouse nephrogenesis and in collecting duct cysts of the cpk/cpk mouse. *Experimental Nephrology*, v.10, p.34–42, 2002.
- HIPPER, M. M.; O'TOOLE, P. S.; THORBURN, A. Autophagy in Cancer: Good, Bad or Both. *Cancer Research*, v.66, p.9349-5, 2006.
- HOPFNER, M.; LEMMER, K.; JANSEN, A.; HANSKI, C.; RIECKEN, E.O.; GAVISH, M.; MANN B.; BUHR, H. GLASSMEIER, G.; SCHERUBL, H. Expression of functional P2-purinergic receptors in primary cultures of human colorectal carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.251, p.811-7, 1998.
- HOEPFNER, M.; KAP, H.; JANSEN, A.; LEMMER, K.; HANSKI, C.; RIECKEN, E. O.; SCHERUEBL, H. Extracellular ATP induces apoptosis and inhibits growth of colorectal carcinomas. *Gastroenterology*, v.116, p.A423, 1999.
- HORSTMAN, D. A.; TENNES, K. A.; PUTNEY, J. W. JR. ATP-induced calcium mobilization and inositol 1,4,5-triphosphate formation in H-35 hepatoma cells. *FEBS Letters*, v.204,p.189–192,1986.
- HORVATH, I.; GLATZ, A.; VARVASOVSZKI, V.; TOROK, Z.; PALI, T.; BALOGH, G.; KOVACS, E.; NADASDI, L.; BENKO, S.; JOO, F.; VIGH, L. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene". *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, v.95, p.3513–3518, 1998.
- HUANG, S.; CHEN, Y.; WU, W.; OUYANG, N.; CHEN, J.; LI, H.; LIU, X.; SU, F.; LIN, L.; YAO, Y. miR-150 promotes human breast cancer growth and malignant behavior by targeting the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor. *PLoS One*, v.8, p.e80707, 2013.
- HUILGOL, N. G.; GUPTA, S.; SRIDHAR, C. R. Hyperthermia with radiation in the treatment of locally advanced head and neck cancer: a report of randomized trial. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v.6, p.492–496, 2010a.
- HUILGOL, N. G.; GUPTA, S.; DIXIT, R. Chemoradiation with hyperthermia in the treatment of head and neck cancer. *International Journal of Hyperthermia*, v.26, p.21–25, 2010b.
- HURWITZ, M. D.; HANSEN, J. L.; PROKOPIOS-DAVOS, S.; MANOLA, J.; WANG, Q.; BORNSTEIN, B. A.; HYNYNEN, K.; KAPLAN, I. D. Hyperthermia combined with radiation for the treatment of locally advanced prostate cancer: long-term results from Dana-Farber Cancer Institute study 94–153. *Cancer*, v.117, p.510–516, 2011.
- IDE, S.; NISHIMAKI, N.; TSUKIMOTO, M.; KOJIMA, S. Purine receptor P2Y6 mediates cellular response to gamma-ray-induced DNA damage. *The Journal of Toxicological Science*, v.39,p.15-23, 2014.

- IDZKO, M.; FERRARI, D.; RIEGEL, A. K.; ELTZSCHIG, K. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood*, v.124, n.7, p.1029-37, 2014.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estatísticas do Câncer, Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>> Acesso em: 06 out. 2015.
- IRISH, C. E.; BROWN, J.; GALEN, W. P.; GALLUCCI, J. J.; HYMAN, M. D.; HOROWITZ, I. J.; SNEDECOR, P. A.; BAKER, H. W. Thermoradiotherapy for persistent cancer in previously irradiated fields. *Cancer*, v.57, p.2275–2279, 1986.
- JELASSI, B.; ANCHELIN, M.; CHAMOUTON, J.; CAYUELA, M. L.; CLARYSSE, L.; LI, J.; GORE, J.; JIANG, L.H.; ROGER, S. Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. *Carcinogenesis*, v.34, p.1487–1496, 2013.
- JELASSI, B.; CHANTOME, A.; ALCARAZ-PEREZ, F.; BAROJA-MAZO, A.; CAYUELA, M. L.; PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A.; ROGER, S. P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels-and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene*, v.30, p.2108–2122, 2011.
- JIANG, L. H.; BALDWIN, J. M.; ROGER, S.; BALDWIN, S. A. Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms. *Frontiers in Pharmacology*, v.4, p.55, 2013.
- JOACHIMS, M. L.; MARBLE, P.; KNOTT-CRAIG, C.; PASTUSZKO, P.; BLACKBURN, M. R.; THOMPSON, L. F. Inhibition of deoxynucleoside kinases in human thymocytes prevents dATP accumulation and induction of apoptosis. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, v.27, p.816–820, 2008.
- JOHNSTON, J. B. Mechanism of action of pentostatin and cladribine in hairy cell leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, v.52, p.43–45, 2011.
- KALHAN, A.; GHARIBI, B.; VAZQUEZ, M.; JASANI, B.; NEAL, J.; KIDD, M.; MODLIN, I. M.; PFRAGNER, R.; REES D. A.; HAM, J. Adenosine A2A and A2B receptor expression in neuroendocrine tumours: potential targets for therapy. *Purinergic Signalling*, v.8, p.265-74, 2012.
- KHAKH, B. S.; NORTH, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*, V.442, p.527-32, 2006.
- KIM, M.; JIANG, L.H.; WILSON, H. L.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *The EMBO Journal*, v.20, p.6347-58, 2001.
- KIM, S. G.; GAO, Z. G.; SOLTYSIAK, K. A.; CHANG, T. S.; BRODIE, C.; JACOBSON, K. A. P2Y6 nucleotide receptor activates PKC to protect 1321N1 astrocytoma cells against tumor

- necrosis factor induced apoptosis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v.23, p.401-18, 2003.
- KIM, N. H.; PARK, K. S.; SOHN, J. H.; YEH, B. I.; KO, C. M.; KONG, I. D. Functional expression of P2Y receptors in WERI-Rb1 retinoblastoma cells. *Korean J Physiol Pharmacol*, v.15, p.61–66, 2011.
- KONERU, M.; SCHAER, D.; MONU, N.; AYALA, A.; FREY, A. B. Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *Journal of Immunology*, v.174, p.1830–1840, 2005.
- LI, X.; QI, X.; ZHOU, L.; CATERA, D.; ROTE, N. S.; POTASHKIN, J.; ABDUL-KARIM, J. F. W.; GORODESKI, G. I. Decreased expression of P2X7 in endothelial epithelial pre-cancerous and cancer cells. *Gynecologic Oncology*, v.106, p.233–243, 2007.
- LI, X.; QI, X.; ZHOU, L.; FU, W.; ABDUL-KARIM, F. W.; MACLENNAN, G.; GORODESKI, G. I. P2X(7) receptor expression is decreased in epithelial cancer cells of ectodermal, uro-genital sinus, and distal paramesonephric duct origin. *Purinergic Signalling*, v.5, p.351–368, 2009.
- LI, X.; ZHOU, L.; FENG, Y. H.; ABDUL-KARIM, F. W.; GORODESKI, G. I. The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v.15, p.1906-13, 2006.
- LI, X.; GONG, Z.; ZHANG, L.; ZHAO, C.; ZHAO, X.; GU, X.; CHEN, H. Autophagy knocked down by high-risk HPV infection and uterine cervical carcinogenesis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v.8, p.10304-14, 2015.
- LINDEN, J. Adenosine metabolism and cancer. Focus on “Adenosine downregulates DPPiV on HT-29 colon cancer cells by stimulating protein tyrosine phosphatases and reducing ERK1/2 activity via a novel pathway”. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v.291, p. C405-C406, 2006.
- LUK, K. H.; FRANCIS, M. E.; PEREZ, C. A.; JOHNSON, R. J. Combined radiation and hyperthermia: comparison of two treatment schedules based on data from a registry established by the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG). *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, v.10, p.801–809, 1984.
- MAASER, K.; HOPFNER, M.; KAP, H.; SUTTER, A. P.; BARTHEL, B.; VON LAMPE, B.; ZEITZ, M.; SCHERUBL, H. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors. *British Journal of Cancer*, v.86, p.636-44, 2002.
- MADI, L.; BAR-YEHUDA, S.; BARER, F.; ARDON, E.; OCHAION, A.; FISHMAN P. A3 adenosine receptor activation in melanoma cells: association between receptor fate and tumor growth inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.42121-30, 2003.
- MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V.; WHITE, E. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, v.7, p.961-7, 2007.

- MARTIN, D. S.; BERTINO, J. R.; KOUTCHER, J. A. ATP depletion + pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach. *Cancer Research*, v.60, p.6776–6783, 2000.
- MARTIN, D. S.; SPRIGGS, D.; KOUTCHER, J. A. A concomitant ATPdepleting strategy markedly enhances anticancer agent activity. *Apoptosis*, v.6, p.125–131, 2001.
- MATSUMOTO, G.; WADA, K.; OKUNO, M.; KUROSAWA, M.; NUKINA, N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Molecular Cell*, v.44, p.279–289, 2011.
- MEDIAVILLA-VARELA, M.; LUDDY, K.; NOYES, D.; KHALIL, F. K.; NEUGER, A. M.; SOLIMAN, H.; ANTONIA, S. Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth. *Cancer Biology & Therapy*, v.14, n.9, p.860-8, 2013.
- MERIGHI, S.; MIRANDOLA, P.; MILANI, D.; VARANI, K.; GESSI, S.; KLOTZ, K. N.; LEUNG, E.; BARALDI, P. G.; BOREA, P. A. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, v.119, p.923-33, 2002.
- MICHAUD, M.; MARTINS, I.; SUKKURWALA, A. Q.; ADJEMIAN, S.; MA, Y.; PELLEGATTI, P.; SHEN, S.; KEPP, O.; SCOAZEC, M.; MIGNOT, G.; RELLO-VARONA, S.; TAILLER, M.; MENDER, L.; VACCHELLI, E.; GALLUZZI, L.; GHIRINGHELLI, F.; DI VIRGILIO, F.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, v.334, p.1573-7, 2011.
- MONU, N., FREY, A. B. Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8+ tumor-infiltrating T cells. *Cancer Research*, v.67, p.11447–11454, 2007.
- MOROS, E. G.; PENAGARICANO, J.; NOVAK, P.; STRAUBE, W. L.; MYERSON, R. J. Present and future technology for simultaneous superficial thermoradiotherapy of breast cancer. *International Journal of Hyperthermia*, v.26, p.699–709, 2010.
- NAGY, E.; BALOGI, Z.; GOMBOS, I.; AKERFELT, M.; BJORKBOM, A.; BALOGH, G.; TOROK, Z.; MASLYANKO, A.; FISZER-KIERZKOWSKA, A.; LISOWSKA, K.; SLOTTE, P. J.; SISTONEN, L.; HORVATH, I.; VIGH, L. Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, p.7945-7950, 2007.
- NISHIMAKI, N.; TSUKIMOTO, M.; KITAMI, A.; KOJIMA, S. Autocrine regulation of gamma irradiation-induced DNA damage response via extracellular nucleotides-mediated activation of P2Y6 and P2Y12 receptors. *DNA Repair (Amst)*, v.11, p.657-65, 2012.
- NOGI, Y.; KANNO, T.; NAKANO, T.; FUJITA, Y.; TABATA, C.; FUKUOKA, K.; GOTOH, A.; NISHIZAKI, T. AMP converted from intracellularly transported adenosine upregulates p53 expression to induce malignant pleural mesothelioma cell apoptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v.30, p.61–74, 2012.

- OHSHIMA, Y.; TSUKIMOTO, M.; TAKENOUCI, T.; HARADA, H.; SUZUKI, A.; SATO, M.; KITANI, H.; KOJIMA, S. gamma-Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1800, p.40–46, 2010.
- OTHA, A. *et al.* A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.103, n.35, p.13132–13137, 2006.
- OTSUKI, T.; KANNO, T.; FUJITA, Y.; TABATA, C.; FUKUOKA, K.; NAKANO, T.; GOTOH, A.; NISHIZAKI, T. A3 adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in Lu-65 human lung cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v.30, p. 210–20, 2012.
- PANKIV, S.; CLAUSEN, T. H.; LAMARK, T.; BRECH, A.; BRUUN, J. A.; OUTZEN, H.; ØVERVATN, A.; BJØRKØY, G.; JOHANSEN, T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, v.282, p.24131–24145, 2007.
- PELLEGATTI, P.; RAFFAGHELLO, L.; BIANCHI, G.; PICCARDI, F.; PISTOIA, V.; DI VIRGILIO, F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One*, v.3, n.7, p.e2599, 2008.
- PINES, A.; PERRNONE, L.; BIVI, N.; ROMANELLO, M.; DAMANTE, G.; GULISANO, M.; KELLEY, M. R.; QUADRIFOGLIO, F.; TELL, G. Activation of APE1/Ref-1 is dependent on reactive oxygen species generated after purinergic receptor stimulation by ATP. *Nucleic Acids Research*, v.33, n.14, p.4379–94, 2005.
- POCHET, S.; GARCIA-MARCOS, M.; SEIL, M.; OTTO, A.; MARINO, A.; DEHAYE, J. P. Contribution of two ionotropic purinergic receptors to ATP responses in submandibular gland ductal cells. *Cellular Signalling*, v.19, p.2155–2164, 2007.
- RAPAPORT, E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *Journal of Cellular Physiology*, v.114, p. 279–83, 1983.
- RICKLES, R. J.; TAM, W. F.; GIORDANO, T. P.; PIERCE, L. T.; FARWELL, M.; MCMILLIN, D. W.; NECHEVA, A.; CROWE, D.; CHEN, M.; AVERY, W.; KANSRA, V.; NAWROCKI, S. T.; CAREW, J. S.; GLIES, F. J.; MITSIADES, C. S.; BORISY, A. A.; ANDERSON, K. C.; LEE, M. S. Adenosine A2A and beta-2 adrenergic receptor agonists: novel selective and synergistic multiple myeloma targets discovered through systematic combination screening. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.11, p.1432–42, 2012.
- ROBINSON, L. E.; SHRIDAR, M.; SMITH, P.; MURRELL-LAGNADO, R. D. Plasma Membrane Cholesterol as a Regulator of Human and Rodent P2X7 Receptor Activation and Sensitization. *The Journal of Biological Chemistry*, v.289, p.31983–94, 2014.
- ROGER, S.; JELASSI, B.; COUILLIN, I.; PELEGRIN, P.; BRESSON, P.; JIANG, L.H. Understanding the roles of P2X7 receptor in solid tumor progression and therapeutic perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1848, n.10PtB, p.2584–602, 2014.

- ROGER, S.; PELEGRIN, P. P2X7 receptor antagonism in the treatment of cancers. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v.20, n.7, p.875-80, 2011.
- SAI, K.; YANG, D.; YAMAMOTO, H.; FUJIKAWA, H.; YAMAMOTO, S.; NAGATA, T.; SAITO, M.; YAMAMURA, T.; NISHIZAKI, T. A1 adenosine receptor signal and AMPK involving caspase-9/-3 activation are responsible for adenosine-induced RCR-1 astrocytoma cell death. *Neurotoxicology*, v.27, p.458-467, 2006.
- SAITOH, M.; NAGAI, K.; NAKAGAWA, K.; YAMAMURA, T.; YAMAMOTO, S.; NISHIZAKI, T. Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *Biochemical Pharmacology*, v.67, p. 2005–2011, 2004.
- SAITO, M.; YAGUCHI, T.; YASUDA, Y.; NAKANO, T.; NISHIZAKI, T. Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A(1) adenosine receptors. *Cancer Letters*, v.290, p.211-5, 2010.
- SAUER, A. V.; BRIGIDA, I.; CARRIGLIO, N.; HERNANDEZ, R. J.; SCARAMUZZA, S.; CLAVENNA, D.; SANVITO, F.; POLIANI, P. L.; GAGLIANI, N.; CARLUCCI, F.; TABUCCHI, A.; RONCAROLO, M. G.; TRAGGIAI, E.; VILLA, A.; AIUTI, A. Alterations in the adenosine metabolism and CD39/CD73 adenosinergic machinery cause loss of Treg cell function and autoimmunity in ADA-deficient SCID. *Blood*, v.119, p.1428–39, 2012.
- SCHAFER, R.; SEDEHIZADE, F.; WELTE, T.; REISER, G. ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, v.285, n.2, p.L376-85, 2003.
- SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N.; WACHOLDER, S.; KINNEY, W.; GAGE, J. C.; CASTLE, P. E. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v.103, p.368–383, 2011.
- SCHRIER, S. M.; VAN TILBURG, E. W.; VAN DER MEULEN, H.; IJZERMAN, A. P.; MULDER, G. J.; NAGELKERKE, J. F. Extracellular adenosine-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells: studies on involvement of adenosine receptors and adenosine uptake. *Biochemical Pharmacology*, v.61, p.417–2, 2001.
- SERRA, S.; HORENSTEIN, A. L.; VAISITTI, T.; BRUSA, D.; ROSSI, D.; LAURENTI, L.; D'ARENA, G.; COSCIA, M.; TRIPODO, C.; INGHIRAMI, G.; ROBSON, S. C.; GAIDANO, G.; MALAVASI, F.; DEAGLIO, S. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*, v.118, p.6141-52, 2011.
- SEEGENSCHMIEDT, M. H.; SAUER, R.; MIYAMOTO, C.; CHALAL, J. A.; BRADY, L. W. Clinical experience with interstitial thermoradiotherapy for localized implantable pelvic tumors. *American Journal of Clinical Oncology*, v.16, p.210–222, 1993.
- SEETULSINGH-GOORAH, S. P.; STEWART, B. W. Growth inhibition of HL-60 cells by extracellular ATP: concentration-dependent involvement of a P2 receptor and adenosine generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.250, p.390–396, 1998.

- SHABBIR, M.; BURNSTOCK, G. Purinergic receptor-mediated effects of adenosine 5'-triphosphate in urological malignant diseases. *International Journal of Urology*, v.16, p.143-50, 2009.
- SHABBIR, M.; THOMPSON, C. S.; JARMULOWICZ, M.; MIKHAILIDIS, D. P.; BURNSTOCK, G. Effect of extracellular ATP on the growth of hormone refractory prostate cancer in vivo. *BJU International*, v.102, p.108-112, 2008a.
- SHABBIR, M.; RYTEN, M.; THOMPSON, C.; MIKHAILIDIS, D.; BURNSTOCK, G. Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer. *BJU International*, v.101, n.1, p.106-12, 2008b.
- SODELARO BILBAO P.; BOLAND, R. Extracellular ATP regulates FoxO family of transcription factors and cell cycle progression through PI3K/Akt in MCF-7 cells. *Biochimica at Biophysica Acta*, v.1830, p.4456-69, 2013.
- SUPLAT-WYPYCH, D.; DYGAS, A.; BARAŃSKA, J. 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP-mediated calcium signaling in rat glioma C6 cells: role of the P2Y2 nucleotide receptor. *Purinergic Signalling*, v.6, p.317-325, 2010.
- SOUZA, C. O.; SANTORO, G. F.; FIGLIUOLO, V. R.; NANINI, H. F.; DE SOUZA, H. S.; CASTELO-BRANCO, M. T.; ABALO, A. A.; PAIVA, M. M.; COUTINHO, C. M.; COUTINHO-SILVA, R. Extracellular ATP induces cell death in human intestinal epithelial cells. *Biochimica at Biophysica Acta*, v.1820, p.1867-78, 2012.
- STAGG, J.; DIVISEKERA, U.; DURET, H.; SPARWASSER, T.; TENG, M. W.; DARCY, P. K.; SMYTH, M. J. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Research*, v.71, p.2892-900, 2011.
- SUN, X.; HAN, L.; SETH, P.; BIAN, S.; LI, L.; CSIZMADIA, E.; JUNGER, W. G.; SCHMELZLE, M.; USHEVA, A.; TAPPER, E. B.; BAFFY, G.; SUKHATME, V. P. WU, Y.; ROBSON, S. C. Disordered purinergic signaling and abnormal cellular metabolism are associated with development of liver cancer in Cd39/Entpd1 null Mice. *Hepatology*, v.57, p.205-216, 2013.
- SYNOWITZ, M.; GLASS, R.; FARBER, K.; et al. A1 adenosine receptors in microglia control glioblastoma-host interaction. *Cancer Research*, v.66, p.8550-7, 2006.
- TAFANI, M.; DI VITO, M.; FRATI, A.; PELLEGRINI, L.; DE SANTIS, E.; SETTE, G.; ERAMO, A.; SALE, P.; MARI, E.; SANTORO, A.; RACO, A.; SALVATI, M.; DEMARIA, R.; RUSSO, M. A. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *Journal of Neuroinflammation*, v.8, p.32, 2013.
- TAKAI, E.; TSUKIMOTO, M.; HARADA, H.; KOJIMA, S. Autocrine signaling via release of ATP and activation of P2X7 receptor influences motile activity of human lung cancer cells. *Purinergic Signalling*, 2014.

- TAKAI, E.; TSUKIMOTO, M.; HARADA, H.; SAWADA, K.; MORIYAMA, Y.; KOJIMA, S. J. Autocrine regulation of TGF- $\beta$ 1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, v.125, p.5051–5060, 2012.
- TAMAJUSUKU, A. S.; VILLODRE, E. S.; PAULUS, R.; COUTINHO-SILVA, R.; BATTASSTINI, A. M.; WINK, M. R.; LENZ, G. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.109, p.983–991, 2010.
- TREPEL, J.; MOLLAPOUR, M.; GIACCONE, G.; NECKERS, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, v. 10, p.537-49, 2010.
- TSUCHIYA, A.; KANNO, T.; SAITO, M.; MIYOSHI, Y.; GOTOH, A.; NAKANO, T.; NISHIZAKI T. Intracellularly transported adenosine induces MCF-7 human breast cancer cells by accumulating AMID in the nucleus. *Cancer Letters*, v. 321, p.65-72, 2012.
- VAN DEN BERG, C. A.; VAN DE KAMER, J. B.; DE LEEUW, A. A.; JEUKENS, C. R.; RAAVMAKERS, B. W.; VAN VULPEN, M.; LAGENDIJK, J. J. Towards patient specific thermal modeling of the prostate. *Physics in Medicine and Biology*, v.51, p.809–825, 2006.
- VASANTHAN, A.; MITSUMORI, M.; PARK, J. H.; ZHI-FAN, Z.; YU-BIN, Z.; OLIYNYCHENKO, P.; TATSUZAKI, H.; TANAKA, Y.; HIRAOKA, M. Regional hyperthermia combined with radiotherapy for uterine cervical cancers: a multi-institutional prospective randomized trial of the international atomic energy agency. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, v.61, p.145–153, 2005.
- VARANI, K.; MANIERO, S.; VINCENZI, F.; TARGA, M.; STEFANELLI, A.; MANISCALCO, P.; MARTINI, F.; TOGNON, M.; BOREA, P. A. A3 receptors are overexpressed in pleura from patients with mesothelioma and reduce cell growth via Akt/ nuclear factor-kB pathway. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.183, p.522–30, 2011.
- VAZQUEZ-CINTRON, E. J.; MONU, N. R.; BURNS, J. C.; BLUM, R.; CHEN, G.; LOPES, P.; MA, J.; RADOJA, S.; FREY, A. B. Protocadherin-18 is a novel differentiation marker and an inhibitory signaling receptor for CD8+ effector memory T cells. *PLoS One*, v.7, p.e36101, 2012.
- VAZQUEZ-CUEVAS, F. G.; MARTINEZ-RAMIREZ, A. S.; ROBLES-MARTINEZ, L.; GARAY, E.; GARCIA-CARRANCA, A.; PEREZ-MONTIEL, D.; CASTANEDA-GARCIA, C.; ARELLANO, R. O. J. Paracrine stimulation of P2X7 receptor by ATP activates a proliferative pathway in ovarian carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.115, p.1955-66, 2014.
- VIGH, L.; MARESCA, B.; HARWOOD, J. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes. *Trends in Biochemical Sciences*, v.23, p.369–373, 1998.
- VIGH, L.; MARESCA, B. Dual role of membranes in heat stress: As thermosensors modulate the expression of stress genes and by interacting with stress proteins, re-organize their own lipid order and functionality. In: *Cell and Molecular Responses to Stress*, (eds) Storey, K. B.; Storey, J. M. (Elsevier, Amsterdam), p.173–188, 2002.

- VIGH, L.; ESCRIBA, P.; SONNLEITNER, A.; SONNLEITNER, M.; PIOTTO, S.; MARESCA, B.; HORVATH, I.; HARWOOD, L. J. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function. *Progress in Lipid Research*, v.44, p.303–344, 2005.
- VINCENZI, F.; TARGA, M.; CORCIULO, C.; GESSI, S.; MERIGHI, S.; SETTI, S.; CADOSSO, R.; BOREA, P. A.; VARANI, K. The anti-tumor effect of A3 adenosine receptors is potentiated by pulsed electromagnetic fields in cultured neural cancer cells. *PLoS One*, v.7, n.6, p.e39317, 2012.
- VOLONTE, C.; AMADIO, S.; D'AMBROSI, N.; COLPI, M.; BURNSTOCK, G. P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacology & Therapeutics*, v.112, p.264-80, 2006.
- WANG, Q.; WANG, L.; FENG, Y. H.; LI, X.; ZENG, R.; GORODESKI, G. I. P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, v.287, p.C1349-58, 2004a.
- WANG, X.; ARCUINO, G.; TAKANO, T.; LIN, J.; PENG, W.G.; WANG, P.; LI, P.; XU, Q.; LIU, Q.S.; GOLDMAN, S.A.; NEDERGAARD, M. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nature Medicine*, v.10, n.8, p.821-7, 2004b.
- WEBER, F. C.; ESSER, P. R.; MULLER, T.; GANESAN, J.; PELLEGATTI, P.; SIMON, M. M.; ZEISER, R.; IDZKO, M.; JAKOB, T.; MARTIN, S. F. Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine*, v.207, p.2609-19, 2010.
- WEI, Q.; COSTANZI, S.; BALASUBRAMANIAN, R.; GAO, Z. G.; JACOBSON, K. A. A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Purinergic Signalling*, v.9, p.271-80, 2013.
- WEI, W.; RYU, J. K.; CHOI, H. B.; MCLARNON, J. G. Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 gliomas cells. *Cancer Letters*, v.260, p.79–87, 2008.
- WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 Receptors and cancer. *Trends in Pharmacological Science*, v.27, n.4, p.211-7, 2006.
- WHITE, N.; RYTEN, M.; CLAYTON, E.; BUTLER, P.; BURNSTOCK, G. P2Y purinergic receptors regulate the growth of human melanomas. *Cancer letters*, v.224, n.1, p.81-91, 2005a.
- WHITE, N.; BUTLER, P. E.; BURNSTOCK, G. Human melanomas express functional P2X(7) receptors. *Cell and Tissue Research*, n.321, p.411-8, 2005b.
- WHITE, N.; KNIGHT, G. E.; BUTLER, P. E.; BURNSTOCK, G. An in vivo model of melanoma: treatment with ATP. *Purinergic Signalling*, v.5, p.327–333, 2009.

WHO. World Health Organization. Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 15 out. 2015

- WILHELM, K.; GANESAN, J.; MULLER, T.; DURR, C.; GRIMM, M.; BEILHACK, A.; KREML C. D.; SORICHTER, S.; GERLACH, U. V.; JUTTNER, E.; ZERWECK, A.; GARTNER, F.; PELLEGGATTI, P.; DI VIRGILIO, F.; FERRARI, D.; KAMBHAM, N.; FISCH, P.; FINKE, J.; IDZKO, M.; ZEISER, R. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nature Medicine*, v.16, p.1434-8, 2010.
- WU, P. Y.; LIN, Y. C.; CHANG, C. L.; LU, H. T.; CHIN, C. H. T.; HSU, T.; CHU, D.; SUN, S. H. Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Cellular Signalling*, v.21, p.881–891, 2009.
- WU, Y.; SUN, X.; KACZMAREK, E.; DWYER, K. M.; BIANCHI, E.; USHEVA A.; ROBSON, S. C. RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *The Biochemical Journal*, v.396, p.23–30, 2006.
- YANG, D.; YAGUCHI, T.; YAMAMOTO, H.; NISHIZAKI, T. Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in HuH- 7 human hepatoma cells by downregulating c- FLIP expression causing caspase- 3/8 activation. *Biochemical Pharmacology*, v.73, p.1665–1675, 2007.
- YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, v.22, p.2124–131, 2010.
- YANG, D.; YAGUCHI, T.; NAKANO, T.; NISHIZAKI, T. Adenosine activates AMPK to phosphorylate Bcl- XL responsible for mitochondrial damage and DIABLO release in HuH- 7 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v.27, p.71–78, 2011.
- YASUDA, Y.; SAITO, M.; YAMAMURA, T.; YAGUCHI, T.; NISHIZAKI, T. Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase- 9/3 via A(2a) adenosine receptors. *Journal of Gastroenterology*, v.44, p.56-65, 2009.
- YAMADA, K.; FUKAO, Y.; HAYASHI, M.; FUKAZAWA, M.; SUZUKI, I.; NISHIMURA, M. Cytosolic HSP90 Regulates the Heat Shock Response That Is Responsible for Heat Acclimation in Arabidopsis thaliana. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 37794–37804, 2007.
- ZAGAR, T. M.; OLESON, J. R.; VUJASKOVIC, Z.; DEWHIRST, M. W.; CRACIUNESCU, O. I.; BLACKWELL, K. L.; PROSNITZ, L. R.; JONES, E. L. Hyperthermia combined with radiation therapy for superficial breast cancer and chest wall recurrence: a review of the randomised data. *International Journal of Hyperthermia*, v.26, p.612–617, 2010.
- ZHANG, Z.; XIE, Z.; SUN, G.; YANG, P.; LI, J.; YANG, H.; XIAO, S.; LIU, Y.; QIU, H.; QIN, L.; ZHANG, C.; ZHANG, F.; SHAN, B. Reversing drug resistance of cisplatin by hsp90 inhibitors in human ovarian cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v.8, p.6687-701, 2015.

ZHOU, J. Z.; RIQUELME, M. A.; GAO, X.; ELLIES, L. G.; SUN, L. Z.; JIANG, J. X. Differential impact of adenosine nucleotides released by osteocytes on breast cancer growth and bone metastasis. *Oncogene*, v.34, p.1831-42, 2014.

ZHOU, L.; QI, X.; POTASHKIN, J. A.; ABDUL-KARIM, F. W.; GORODESKI, G. I. MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *The Journal of Biological Chemistry*, v.283, p.28274–28286, 2008.