



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

ALESSANDRA VALÉRIA DE SOUSA FARIA

**PRIMEIRA ETAPA DA DISSEMINAÇÃO HEMATOGENICA DE CÉLULAS DE
CÂNCER DE COLORRETAL: INFLUÊNCIA DE PROTEÍNAS TIROSINA
FOSFATASES E DO 3-BROMOPIRUVATO**

CAMPINAS

2020

ALESSANDRA VALÉRIA DE SOUSA FARIA

**PRIMEIRA ETAPA DA DISSEMINAÇÃO HEMATOGENICA DE CÉLULAS DE
CÂNCER DE COLORRETAL: INFLUÊNCIA DE PROTEÍNAS TIROSINA
FOSFATASES E DO 3-BROMOPIRUVATO**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Biologia Funcional e
Molecular, na Área de Bioquímica.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CARMEN VERÍSSIMA FERREIRA HALDER

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE A SER DEFENDIDA PELA ALUNA
ALESSANDRA VALÉRIA DE SOUSA FARIA E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CARMEN VERÍSSIMA
FERREIRA HALDER

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F225p Faria, Alessandra Valeria de Sousa, 1993-
Primeira etapa da disseminação hematogênica de células de câncer colorretal : influência de proteínas tirosina fosfatase e do 3-bromopiruvato / Alessandra Valeria de Sousa Faria. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Carmen Veríssima Ferreira Halder.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neoplasias colorretais. 2. Plaquetas (Sangue). 3. Fosfatases. 4. LMW-PTP. 5. Sinalização celular. 6. Metástase. I. Ferreira, Carmen Veríssima, 1969-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Hematogenous tumor metastasis in colorectal cancer cells : influence of tyrosine phosphatases and 3-bromopyruvate

Palavras-chave em inglês:

Colorectal neoplasms

Blood platelets

Phosphatases

LMW-PTP

Cell signaling

Neoplasm metastasis

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carmen Veríssima Ferreira Halder [Orientador]

Marcelo Bispo de Jesus

Ana Carolina Santos de Souza Galvão

Edgar Julian Paredes Gamero

Fábio Rogério de Moraes

Data de defesa: 16-09-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1161-5724>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3581717760575136>

Campinas, 16 de setembro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder (presidente)

Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus (membro interno)

Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão (membro externo)

Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero (membro externo)

Dr. Fábio Rogério de Moraes (membro externo)

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa em Biologia Funcional e Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

Dedicatória

As minhas avós
Liberata Chiarelli Faria
e Ana Leite de Sousa

Agradecimentos

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.

A minha família, meu pai Wagner Faria, minha mãe Rosemeire A. de Sousa Faria, e minha irmã Gisele Debora de Sousa Faria, por todo o esforço dedicado em todos esses anos do meu desenvolvimento intelectual, cultural, social e psicológico.

A orientação da professora Carmen, que esteve sempre presente em todo desenvolvimento do trabalho, disponibilizou laboratório, tempo e confiança desde a iniciação científica, mestrado e durante o seguimento desse projeto de doutorado.

A Dra. Sheila Siqueira Andrade, por compartilhar pacientemente seu imenso conhecimento em biologia e função de plaquetas.

A disponibilidade da banca de qualificação Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori, Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero, Dra. Roberta Regina Ruela de Sousa, Dra. Valeria Scorsato, realizada em 30 de setembro de 2019.

A disponibilidade da banca de defesa, Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus, Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero, Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão, Prof. Dr. Erich de Paula, Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy, Dra. Luciana de Campos Leite Medeiros, e Dr. Fábio Rogério de Moraes.

A todos os colegas do Laboratório de Bioensaios *in vitro* e Transdução de Sinais que compartilharam do cotidiano e desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Claudia Soraggi e Luís Henrique Ribeiro pelo apoio técnico durante a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, secretaria do programa de Pós-Graduação, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual e a Universidade Estadual de Campinas.

A Erasmus University e Erasmus Medical Center pela oportunidade de estágio, prof. dr. Maikel P. Peppelenbosch e dra. Gwenny M. Fuhler pela orientação durante o período de estágio.

Aos meus familiares, que mesmo a distância, me apoiaram durante o processo.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

Também agradeço as agências de fomentos Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior através do Programa de bolsas de Excelência Acadêmica – CAPES/PROEX e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que contribuíram com diversos financiamentos durante a minha vida acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, número processo: 1650398; e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - (número do processo da bolsa no país: 2017/08119-8 e número do processo da bolsa no exterior modalidade BEPE: 2018/00736-0).

Resumo

Apesar do grande progresso no desenvolvimento de protocolos de tratamento do câncer, a eficácia da terapia de diversos tumores ainda é um desafio, principalmente nos casos metastáticos. Desta forma, o conhecimento dos mecanismos moleculares por trás das diferentes etapas do processo metastático é de grande importância para o estabelecimento de novos protocolos terapêuticos. Neste contexto, a identificação de mediadores chaves em vias de sinalização que fornecem vantagens às células tumorais para sobrevivência em condições atípicas, como é o caso da metástase, tem se mostrado promissor. Em células eucarióticas, fosforilação e desfosforilação catalisadas por proteínas quinases e proteínas fosfatases, respectivamente, são as principais formas de regulação pós-tradução. Estudos conduzidos por nosso grupo foram os primeiros a demonstrar que membros da família das proteínas tirosina fosfatases (PTPs): Proteína Tirosina Fosfatase de Baixa Massa Molecular (LMWPTP) e Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B) têm papéis relevantes na progressão do câncer e correlação com pior prognóstico. Portanto, o presente estudo teve como principal objetivo investigar se o nível de ambas PTPs, em células de tumores gastrointestinais se correlaciona com maior capacidade de interação das mesmas com plaquetas. Ademais, a capacidade do análogo do piruvato (3-Bromopiruvato) em atuar como disruptor desta interação e da hiper-reatividade plaquetária foi avaliada. Para tal, foram realizadas análises de expressão (gênica e proteica), nível de fosforilação, atividade enzimática, migração, formação de colônias, utilização de cultura 2D e 3D, bem como foi empregada a técnica de silenciamento CRISPR-Cas9. Além disso, foi feita uma ampla análise da expressão de LMWPTP em amostras de pacientes (plaquetas e biópsias de tecidos) e em banco de dados públicos disponíveis. Foi identificado que na concentração de 100µM, 3-Bromopiruvato foi capaz de reduzir a porcentagem de agregação plaquetária em indivíduos saudáveis e pacientes com câncer gastrointestinal. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que: 1) O 3-Bromopiruvato diminui a atividade da LMWPTP e PTP1B, com reflexo na diminuição da hiper-reatividade plaquetária; 2) Alterações morfológicas em células CRC induzidas por plaquetas favorecem migração e maior capacidade de formação de sítio secundário; 3) 3-Bromopiruvato tem potencial para ser utilizado visando à prevenção do tromboembolismo e etapa pré-metastática em pacientes oncológicos. Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que LMWPTP e PTP1B participam de diversos eventos e componentes do processo de metástase, principalmente na primeira etapa disseminação hematogênica (*crosstalk* plaquetas-células tumorais), contribuindo para maior agressividade dos tumores.

Abstract

Despite great progress in the development of cancer treatment protocols, the effectiveness of therapy for several tumors is still a challenge, especially in metastatic cases. Thus, knowledge of the molecular mechanisms behind the different stages of the metastatic process is of great importance for the establishment of new therapeutic protocols. In this context, the identification of key mediators in signaling pathways that provide survival advantage for tumor cells, even under atypical conditions, such as metastasis, has attracted attention. In eukaryotic cells, phosphorylation and dephosphorylation, catalyzed by protein kinases and protein phosphatases, respectively, are the main ways of post-translational regulation. Studies conducted by our group were the first to demonstrate that members of the family of protein tyrosine phosphatases (PTPs): Low Molecular Protein Tyrosine Phosphatase (LMWPTP) and Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) have relevant roles in cancer progression and correlation with worse prognosis. Therefore, the main goal of the present study was to investigate whether the level of both PTPs in gastrointestinal cancer cells correlates with their greater ability to interact with platelets. In addition, the ability of a pyruvate analog (3-Bromopyruvate) to act as a disruptor of this interaction and of platelet hyperreactivity was evaluated. To drive those results, it was analyzed expression, phosphorylation status, enzymatic activity, migration, colony formation, 2D and 3D cultures, as well as, knockdown using CRISPR-Cas9. Further, it was investigated the expression of LMWPTP in patient samples (platelets and tissue biopsy) and public data record available. It was identified that at a concentration of 100 μ M, 3-Bromopyruvate was able to reduce the percentage of platelet aggregation from healthy individuals and patients with gastrointestinal cancer. The results obtained in this study showed that: 1) 3-Bromopyruvate decreases the activity of LMWPTP and PTP1B, reflecting the decrease in platelet hyper-reactivity; 2) Platelet-induced morphological changes in CRC cells favor migration and secondary site formation; 3) 3-Bromopyruvate has the potential to be used in order to prevent thromboembolism and pre-metastatic stage in cancer patients. Altogether, it was demonstrated that LMWPTP and PTP1B participate in several events and components of the metastasis process, in the first step of hematogenous dissemination (cancer cell-platelets crosstalk), contributing to greater aggressiveness of the tumors.

Lista de ilustrações

	Pág.
Figura 1. Etapas da ativação plaquetária até formação de agregado.	20
Figura 2. Etapas do processo metastático.	23
Figura 3. Interação célula tumoral e plaqueta.	24
Figura 4. Interação de células tumorais e plaquetas na circulação sanguínea.	26
Figura 5. Parâmetros avaliados em agregação plaquetária por sistema óptico.	37
Figura 6. Efeito do 3-bromopiruvato em plaquetas tempo-dependente.	44
Figura 7. Análise global de fosfatases em plaquetas de indivíduos sadios na presença de agonistas e 3-bromopiruvato.	45
Figura 8. LMWPTP e PTP1B respondem diferentemente ao estímulo de plaquetas por colágeno e ristocetina.	46
Figura 9. Expressão de tirosina fosfatase e atividade de quinases em plaquetas estimuladas por colágeno – diferente sensibilidade frente a inibidor de Src e agonistas colágeno e ristocetina.	47
Figura 10. 3-Bromopiruvato tem capacidade de inibir fosfatases isoladas de plaquetas.	48
Figura 11. 3-Bromopiruvato inibe a sinalização intracelular em plaquetas.	49
Figura 12. 3BP diminui atividade metabólica e função plaquetária.	50
Figura 13. Influência do 3BP na agregação plaquetária estimulada por colágeno.	51
Figura 14. Influência do 3BP na ativação plaquetária estimulada por trombina.	52
Figura 15. Influência do 3BP na agregação plaquetária estimulada por ristocetina.	53
Figura 16. Função plaquetária é afetada negativamente por inibidor seletivo de PTP1B.	54
Figura 17. Função plaquetária não é inibida por inibidor seletivo de SHP1.	55
Figura 18. Efeitos de 3-bromopiruvato em células de câncer colorretal.	56
Figura 19. Agregação induzida por células tumorais, formação de trombo e ativação plaquetária reduzida por 3BP.	58
Figura 20. Expressão de proteínas marcadoras de ativação plaquetária em plaquetas mantidas em co-cultura com células CRC.	59
Figura 21. Expressão de proteínas de membrana em plaquetas ativadas por células CRC em co-cultura.	60
Figura 22. Plaquetas de pacientes com câncer de esôfago e CRC apresentam hiperagregabilidade que pode ser inibida por 3-Bromopiruvato.	62
Figura 23. Inibição de agregação plaquetária com 3-Bromopiruvato em plaquetas de pacientes com câncer gastrointestinal.	63
Figura 24. Expressão de LMWPTP em linhagens de CRC.	65
Figura 25. Etapas da agregação plaquetária afetadas pela 3-Bromopiruvato revelados por este estudo.	67
Figura 26. Gráficos de agregação plaquetária.	68

Figura 27. Expressão de LMWPTP em HCT116 na presença de plaquetas promove migração celular em HCT116.	72
Figura 28. Presença de plaquetas em HT29 não favorece migração e/ou proliferação.	73
Figura 29. Formação de esferoide de células HCT116.	76
Figura 30. Imunofluorescência de esferoide de células HCT116 marcação de LMWPTP.	77
Figura 31. Formação de esferoides em HT29 na presença e ausência de plaquetas.	79
Figura 32. Imunofluorescência de esferoide de células HT29 com marcação de LMWPTP.	80
Figura 33. LMWPTP knockdown contribui, para em parte, diminuir formação de colônias em células HT29.	82
Figura 34. Formação de colônia em HCT116 shScramble e shLMWPTP.	83
Figura 35. Expressão de LMWPTP em câncer de esôfago.	87
Figura 36. Expressão de LMWPTP em câncer de estômago.	88
Figura 37. Expressão de LMWPTP em CRC.	89
Figura 38. Resumo da contribuição de plaquetas em diferentes etapas da progressão tumoral e influência do 3-bromopiruvato (3BP) em cada etapa da metástase: desde a preparação do microambiente tumoral até a colonização metastática.	93

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1. Compostos utilizados para tratamento de plaquetas.	33
Tabela 2. Informações sobre linhagens celulares	34
Tabela 3. Linhagens celulares silenciadas	34
Tabela 4. Anticorpos usados em ensaio de western blot e microscopia	40
Tabela 5. IC ₅₀ para células CRC.	56

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Extenso
3BP	3-bromopiruvato
5-FU	5-fluoracil
ADP	Adenosina difosfato, do inglês, <i>adenosine diphosphate</i>
AT	Trombose arterial, do inglês <i>arterial thrombosis</i>
ATCC	<i>The Global Bioresource Center</i>
AU	Unidades arbitrárias, do inglês <i>arbitrary units</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CRC	Câncer Colorretal ou do inglês, <i>Colorectal Cancer</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido tetra-acético etileno diamina
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico, do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ácido tetra-acético etileno glicol
Erk	Quinase regulada por sinal extracelular
FAK	Quinase de adesão focal, do inglês, <i>focal adhesion kinase</i>
FFPE	Parafina-formalina
FvW	Fator de von Willebrand
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
HRP	Do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
IC ₅₀	Do inglês, <i>half maximal inhibitory concentration</i>
LMWPTP	Proteína tirosina quinase de baixo peso molecular, do inglês <i>Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mTOR	Do inglês, <i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAR	Do inglês, <i>protease-activated receptor</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PK	Proteína quinase, do inglês <i>Protein Kinase</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil

pNPP	4-Nitrofenilfosfato de di-sódio hexahidratado, do inglês <i>p-Nitrophenyl Phosphate</i>
PP	Proteína Fosfatase, do inglês <i>Protein Phosphatase</i>
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PTEN	Do inglês, <i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase, do inglês <i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B, do inglês <i>protein tyrosine phosphatase 1B</i>
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
SDS	Deoxicolato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
Src	Proteína tirosina quinase Src (sarcoma)
T	Treonina
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris, do inglês <i>Tris-Buffered Saline</i>
TEP	Plaquetas educadas por tumor, do inglês <i>tumor educated platelets</i>
TEPH	Plaquetas educadas por tumor de indivíduos saudáveis, do inglês <i>tumor educated platelets healthy</i>
TCIPA	indução de ativação plaquetária por célula tumoral, do inglês, <i>tumor cell induced platelet activation</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VTE	Eventos de trombose venosa, do inglês <i>venous thromboembolism event</i>
Y	Tirosina

Sumário

	Pág.
1. Introdução	
1.1. Câncer gastrointestinal	17
1.2. Função plaquetária	18
1.2.1. Como plaquetas favorecem ou contribuem para a progressão de doenças?	21
1.3. Etapas da metástase – sobrevivência de células tumorais circulantes	22
1.4. Proteína tirosina fosfatases	27
1.4.1. Proteínas tirosina fosfatases (LMWPTP e PTP1B) no câncer	28
1.5. 3-bromopiruvato	31
2. Objetivos	
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. Materiais e métodos	
3.1. Linhagens celulares	33
3.2. Reagentes e anticorpos	33
3.3. Cultura de células	33
3.4. Oncomine™ e GEOdata	34
3.5. Imunohistoquímica	35
3.6. Dosagem de MTT	36
3.7. Preparação de plaquetas	36
3.8. Informação dos pacientes	37
3.9. Agregação plaquetária por método óptico	37
3.10. Citometria de fluxo com plaquetas	38
3.11. Interação célula tumoral e plaquetas	38
3.12. <i>Western Blot</i>	39
3.13. Imunoprecipitação	40
3.14. Atividade de fosfatases	41
3.15. Ensaio de formação de colônia	41
3.16. Microscopia confocal	41
3.17. Modelo de cultura 3D	42
3.18. Formação de ferida	42
3.19. Análise estatística	43
4. Resultados e discussão	
4.1. 3-Bromopiruvato atua como disruptor da resposta das plaquetas derivadas de indivíduos sadios e pacientes com câncer	44

gastrointestinais e da interação plaquetas-células tumorais	
4.1.1. Modulação de proteínas quinases e fosfatases em plaquetas de indivíduos saudáveis por 3-bromopiruvato	44
4.1.2. Proteínas tirosina fosfatases intracelular são diferentemente moduladas pelos agonistas da função plaquetária: colágeno e ristocetina	45
4.1.3. 3-Bromopiruvato compromete a eficiência de resposta de plaquetas ao colágeno	48
4.1.4. 3-Bromopiruvato diminui o efeito pró-trombótico do colágeno	49
4.1.5. Função plaquetária é dependente de fosfatases específicas	53
4.1.6. Duplo efeito de 3-bromopiruvato na pré-metástase: atuação na interação plaquetas-células de câncer colorretal	55
4.1.7. 3-Bromopiruvato diminui a capacidade de células de câncer de colorretal em ativar plaquetas	57
4.1.8. Hiper-reatividade de plaquetas provenientes de pacientes com câncer gastrointestinal foi reduzida pelo tratamento com 3-Bromopiruvato	61
4.1.9. Contribuição do estudo no contexto da literatura	63
4.2. Plaquetas atuam na biologia de células de câncer de colorretal: migração e nível da LMWPTP	71
4.2.1. Influência das plaquetas em dois parâmetros das células de câncer colorretal: nível da LMWPTP e capacidade de migração em cultura 2D	71
4.2.2. Influência das plaquetas na morfologia e formação de esferoides derivados de células de câncer colorretal	74
4.2.3. Efeito de plaquetas em células HT29 na formação de esferoides	78
4.2.4. Resposta das células LMWPTP silenciadas frente à co-cultura na presença de plaquetas	78
4.2.5. Contribuição do estudo no contexto da literatura	83
4.3. LMWPTP: assinatura biológica em tumores gastrointestinais	86
4.3.1. Contribuição do estudo no contexto da literatura	91
5. Conclusões	92
Referências	94
Anexos	108
1. Comitê de ética	108
2. Declaração de direitos autorais	116

1. Introdução

1.1. Câncer gastrointestinal

Apesar dos grandes avanços no tratamento e diagnóstico de câncer, a incidência e mortalidade dessa doença continuam altas. De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018, houve 9,6 milhões de mortes em decorrência de câncer, sendo 18,1 milhões de novos casos para o mesmo período. Este número tende a aumentar tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, visto que para 2040, as estimativas para esta doença serão de 29,5 milhões de novos casos e mais de 16 milhões de mortes em todo o mundo. Especialmente em câncer do trato gastrointestinal, dados de 2018 mostram que o câncer de estômago foi o quinto mais frequente em todo o mundo (1,0 milhão de casos); o câncer colorretal (CRC, do inglês *colorectal cancer*) foi o terceiro mais frequente em números de mortes (1,8 milhão de casos). Apesar da melhora na qualidade de vida de populações pobres nos países emergentes, houve aumento de hábitos nocivos à saúde e influenciadores no desenvolvimento do câncer, como sedentarismo, consumo excessivo de álcool e tabagismo, obesidade, diabetes, e acometimento por doenças inflamatórias intestinais (Brenner et al, 2014; Bray et al, 2018; Silva et al, 2018).

No Brasil, a estimativa para os anos de 2020-2022, aponta para a ocorrência de aproximadamente 700 mil casos novos de câncer por ano, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Especificamente, para o câncer de estômago foi estimado para 2020, 13.360 casos novos em homens e de 7.870 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de estômago é o sexto mais frequente nas regiões Sudeste e Sul - (INCA, 2020), com número de mortes: 14.761; sendo 9.387 homens e 5.374 mulheres (INCA-SIM, 2018). Já para CRC, é estimado para 2020, 20.540 casos novos em homens e de 20.470 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o CRC é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste e Sul - (INCA, 2020). Número de mortes: 19.603; sendo 9.608 homens e 9.995 mulheres (INCA-SIM, 2018). Nesse sentido, desde a década de 1970, a taxa de incidência de novos casos de câncer gastrointestinal aumenta significativamente. Nos Estados Unidos da América, anualmente ocorre aumento de cerca de 3% na incidência de CRC, especialmente na população jovem-adulta, ou seja, que apresenta idade igual ou inferior a 50 anos. Na população europeia, a incidência de CRC é maior na faixa etária de 20 a 39 anos

(Edwards et al, 2010; Vuik et al, 2019).

De maneira geral, 75-80% dos CRCs se desenvolvem de maneira esporádica, a partir de um desequilíbrio entre a proliferação e a morte de células epiteliais intestinais dessa região que adquirem altas taxas de proliferação e baixas taxas de mortalidade (Morán et al, 2010). De fato, o acúmulo de alterações genéticas em genes como *APC*, *P53*, *K-RAS*, *PTEN*, *PI3KCA* contribui para a gênese e progressão maligna do CRC (Imai & Yamamoto, 2008; Therkildsen et al, 2014). Geralmente, o CRC está confinado à parede do cólon ou à região dos linfonodos regionais. Nestes estágios, esse câncer é normalmente através da cirurgia de remoção do tumor combinada com quimioterapia (Markowitz et al, 2009; Howlader et al, 2013). Entretanto, em 25% dos casos de CRC, há o acometimento de eventos metastáticos para órgãos anatomicamente distantes e, portanto, os protocolos terapêuticos são geralmente ineficazes. Os órgãos comumente afetados são pulmão e fígado, mas também pode apresentar como alvo ossos (Robinson et al, 2017). Dentre os pacientes com metástases, somente 13% apresentam taxa de sobrevida de 5 anos (Markowitz et al, 2009; Howlader et al, 2013; Ganesh et al, 2019).

Além disso, pacientes acometidos por diversos tipos de câncer desenvolvem desequilíbrios relacionados à coagulação, uma vez que diversas evidências indicam o envolvimento de plaquetas com metástase e disseminação hematogênica (Medina et al, 2006; Labelle et al, 2014), e o número de eventos de trombose em pacientes com câncer é maior do que em indivíduos saudáveis. Portanto, o melhor entendimento das alterações moleculares em CRC é essencial para a descoberta de alvos terapêuticos mais efetivos e precisos, para aqueles pacientes que apresentam baixa resposta aos tratamentos atuais e com perfil metastático.

1.2. Função plaquetária

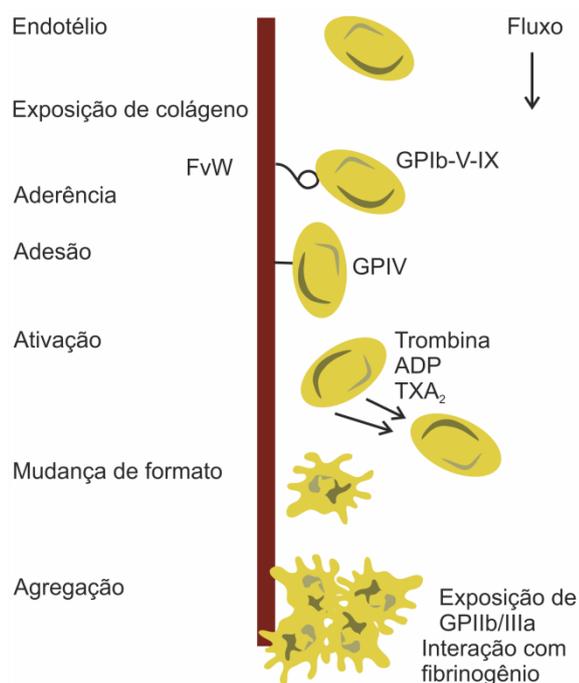
Plaquetas são fragmentos celulares anucleados de origem mieloide que circulam no sangue e apresentam funções específicas (Garraud & Cognasse, 2015). São formadas a partir do citoplasma de megacariócitos e sua membrana é composta por fosfolipídios associados à glicoproteínas, integrinas e diversos receptores que são essenciais para ativação e promoção de suas funções: adesão e agregação. O número de plaquetas circulantes no corpo humano é da ordem de 10^{12} . A meia-vida dessas células é de 8-10 dias, e as plaquetas remanescentes são processadas no baço ou no fígado. Com tamanho pequeno, aproximadamente 2-3 μ m de diâmetro e

formato discoide, plaquetas apresentam um volume mínimo acoplado a um citoesqueleto adaptado à circular por todo sistema circulatório (Patel et al, 2005).

Semelhante às células de origem, as plaquetas contêm proteínas, RNAs, e organelas, como ribossomos, lisossomos e mitocôndrias, que coordenam os processos fisiológicos dessas células, incluindo síntese proteica, apoptose, autofagia e liberação de vesículas extracelulares (Aslan et al, 2011; Zufferey et al, 2012; Zharikov & Shiva, 2013; Best et al, 2015; Lee et al, 2016; Alberio et al, 2017; Mills et al, 2017; Ponomareva et al, 2017). Além disso, plaquetas contêm dois tipos de grânulos, alfa (α), denso (δ) e T (Thon et al, 2012). Durante a produção de plaquetas, megacariócitos produzem os grânulos, em especial os do tipo α , evento que compartilha a mesma via de produção de vesículas extracelulares. O conteúdo e carga liberados do α -grânulo interferem na ação dos agonistas, o que permite a plaqueta exercer diferentes funções específicas ao estímulo. Plaquetas atuam em diversos processos fisiológicos: (i) contenção de sangramento como principal maquinaria de formação de coágulo, (ii) na formação de vasos sanguíneos, pelo suprimento de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos, (iii) reparação de tecido como principal ferramenta no processo de cicatrização e regeneração, e (iv) também atua no sistema imune (Andrade et al, 2019).

A função tradicional de plaquetas envolve majoritariamente a formação de tampão plaquetário para controlar sangramento, e por isso são considerados os primeiros agentes no controle de dano tecidual. O primeiro estímulo para plaquetas é a interação transiente com colágeno exposto pela lesão do tecido. A força hemodinâmica e a proximidade com o vaso induzem a primeira etapa de aderência pela interação de Glicoproteína Ib-V-IX de plaquetas com o Fator de von Willebrand (FvW) do vaso. Essa interação transiente suporta a estabilização da plaqueta no vaso e mantém o fluxo do processo de agregação (**Figura 1**). Glicoproteína IV (GPIV), integrina $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ interagem fortemente com colágeno e a interação por adesão é estabelecida. Para seguir com o processo de ativação propriamente, a Glicoproteína IIb-IIIa interage com o ADP, estimulando a liberação de grânulos e amplificação do processo de ativação e agregação (Bambace & Holmes, 2011; Oliveira et al, 2013; Reinhart et al, 2013; Shin et al, 2017; Pugh et al, 2017). Trombina interage com receptores do tipo ativado por proteases (PAR, do inglês *Protease-activated receptor*), e nessa etapa, a plaqueta apresenta mudança morfológica de discoide a estrelar, e assim estão totalmente ativadas. O formato

estrelar aumenta a superfície de contato dessa plaqueta, que favorece o processo de adesão. E especificamente na última etapa do processo de agregação, fibrina formado a partir de fibrinogênio, por ação de trombina, é capaz de interagir com Glicoproteínas IIb-IIIa e assume a liderança no processo de formação de coágulo, com a participação de fatores solúveis, como fator XIII (Mosesson et al, 2001; Lisman et al, 2005; Litvinov et al, 2016).



Adaptado de Reinhart WH, 2013

Figura 1. Etapas da ativação plaquetária até formação de agregado. A ativação plaquetária vai ocorrer através da exposição de colágeno e FvW, levando ao processo de adesão. Em seguida, a liberação de grânulos plaquetários vão desencadear a segunda onda de ativação plaquetária com alteração na morfologia de plaqueta de discoide a estrelar, e ao final, as plaquetas formarão agregados.

No entanto, as funções não tradicionais exercidas pelas plaquetas - como participação na metástase - merecem destaque, uma vez que os principais componentes intraplaquetários e receptores de membrana que contribuem para a resposta hemostática podem estar relacionados diretamente com a progressão maligna do câncer. Diversos mecanismos estão envolvidos com a ativação plaquetária induzida por células tumorais, e o potencial metastático de células tumorais está relacionado à habilidade dessas células interagirem com plaquetas, pois essa interação confere vantagens de sobrevivência (Medina et al, 2006; Oliveira et al, 2013).

1.2.1. Como plaquetas favorecem ou contribuem para a progressão de doenças?

Além da importante contribuição de plaquetas na homeostase, pacientes com diversas doenças, como por exemplo, em câncer, doenças cardiovasculares (diabetes, hiper-colesterolemia e hipertensão) e infecção viral (exemplificada pelo coronavírus e influenza) desenvolvem aumento de função plaquetária. A hiperagregabilidade está relacionada ao aumento de reatividade plaquetária frente a estímulos, e esse fenômeno é causa de eventos trombóticos (Willoughby et al, 2002; Cooke et al, 2013; Koupenova et al, 2019; Lippi et al, 2020). A hiperagregabilidade plaquetária pode ser atribuída a eventos de tromboembolismo venoso (VTE, do inglês *venous thromboembolism*) e trombose arterial (AT, do inglês *arterial thrombosis*). Esses eventos sobrepõem parcialmente, uma vez que apresentam os mesmos fatores de risco (Aronson e Brenner, 2018). E de fato, a incidência de VTE não é independente de AT (Navi et al, 2017).

Armand Trousseau foi o primeiro a descrever que a desordem plaquetária pode estar relacionada com doenças, em que foi associado o maior risco de eventos trombóticos em pacientes com câncer (Trousseau, 1895). Baseado nisso, a Síndrome de Trousseau consiste em um maior número de VTE comparando indivíduos saudáveis e pacientes com câncer. VTE é a segunda maior causa de mortes em pacientes com câncer, e é a maior causa de hospitalizações e aumento de gastos hospitalares (Khorana et al, 2016). Além disso, VTE em pacientes com câncer de trato gastrointestinal (esôfago e estômago) está relacionado à diminuição de sobrevivência: pacientes que não apresentam VTE têm a sobrevida de 18 meses, enquanto pacientes que apresentam VTE têm sobrevida de 13,9 meses (Marshall-Webb et al, 2017). Aproximadamente 20% de pacientes com câncer desenvolvem tromboembolismo, incluindo eventos pulmonares e venosos, e o risco é especialmente alto em pacientes com câncer de estômago e pâncreas. Em relação às estatísticas de AT, durante os primeiros 6 meses após o diagnóstico de câncer, a incidência de AT em pacientes com câncer aumenta em 2 vezes comparado com indivíduos saudáveis (Navi et al, 2017). A hiper-reatividade plaquetária contribui para o aumento do risco dessas complicações. Entretanto, não existe um método disponível e validado para monitoramento das implicações clínicas da hiperagregabilidade plaquetária (Haemmerle et al, 2018).

A hiperagregabilidade plaquetária está associada ao efeito de tumores sobre a função plaquetária. O tumor pode estimular a agregação plaquetária pela interação direta, por moléculas de adesão, e/ou pelo delivery de material tumoral (como por exemplo, vesículas extracelulares e/ou fatores diversos). Esse fenômeno é descrito como indução de ativação plaquetária por célula tumoral (TCIPA, do inglês *tumor cell induced platelet activation*), recentemente, chamado de “educação” plaquetária (Adachi et al, 1986; Best et al, 2015). A hiperagregabilidade, assim como VTE, é consequência de TCIPA. Esse processo de educação plaquetária pelo tumor está relacionado ao aumento da reatividade plaquetária aos processos de adesão e suporta a disseminação hematogênica como etapa do processo metastático. O VTE vem sendo associado a diversos cânceres, como carcinoma renal (Park et al, 2019); carcinoma hepatocelular (Sahara et al, 2020); câncer de pulmão (Chen et al, 2019); câncer de esôfago e estômago (Marshall-Webb et al, 2017).

1.3. Etapas da metástase – sobrevivência de células tumorais circulantes

Metástase é a causa de cerca de 90% das mortes associadas ao câncer e os mecanismos que governam este processo são pouco entendidos. Durante a disseminação metastática, uma célula de um tumor primário executa a seguinte sequência de etapas: invasão localizada, intravasão para circulação sanguínea, sobrevivência na circulação sanguínea, extravasão para o tecido ou órgão, formação de micrometástases e colonização (Fidler, 2003; Chaffer & Weinberg, 2015) – (**Figura 2**). Um tumor primário pode lançar milhões de células diariamente para a corrente sanguínea, e eventualmente, as metástases se desenvolvem. Ao observar apenas o processo de metástase em relação às células tumorais, é possível dizer que é um processo ineficiente, uma vez que células tumorais individualmente falham na execução em uma, ou mais de uma, das etapas requeridas para a cascata de metástase, outros fatores são necessários para auxiliar na acomodação das células tumorais disseminadas no organismo. Durante esse processo, inúmeros desafios e estímulos impactam o potencial metastático das células tumorais. Metástases para órgãos distantes dependem, em grande parte, da disseminação hematogênica, ou seja, auxílio de fatores presentes no sistema circulatório. Portanto, interações cooperativas e dinâmicas entre células tumorais e células sanguíneas contribuem para o grau de eficiência de ocorrência da metástase (Borensztajn et al, 2008; Spek et al, 2015).

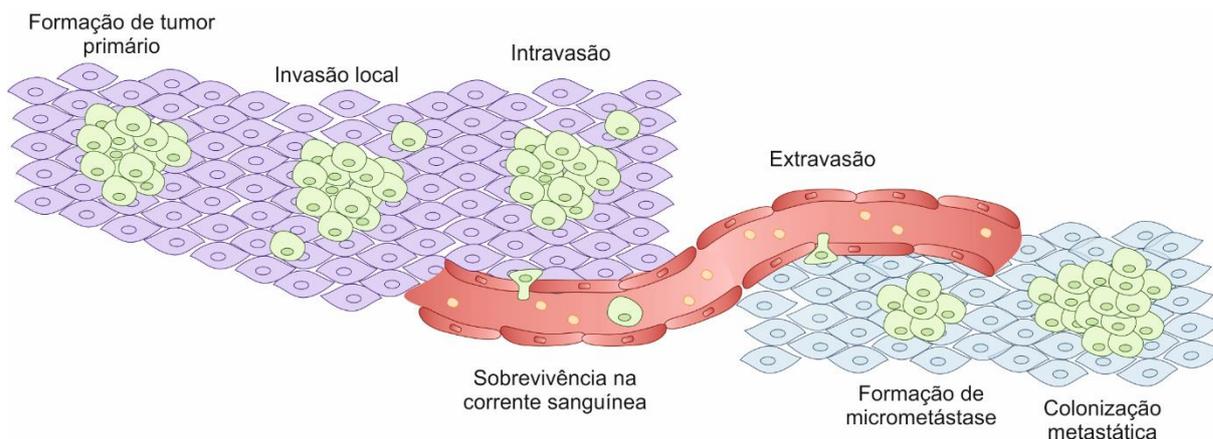


Figura 2. Etapas do processo metastático. A célula tumoral em fase de migração metastática deve seguir o fluxo de invasão localizada, intravasão para circulação sanguínea, sobrevivência na circulação sanguínea, extravasão para o tecido ou órgão, formação de micrometástases e colonização.

Uma vez na circulação, a eficiência da disseminação das células tumorais depende da capacidade das mesmas formarem êmbolos mistos com elementos figurados do sangue, principalmente plaquetas. De forma geral, fator tecidual, selectinas e vias de sinalização podem promover a ativação plaquetária pela interação entre células tumorais e plaquetas. Em termos moleculares, o fator tecidual, expresso nas células tumorais, dispara a formação de trombina e, conseqüentemente, leva à ativação das plaquetas e da cascata de coagulação. Portanto, a fibrina produzida se ligará às integrinas das células tumorais ($\alpha v \beta 3$) e das plaquetas ($\alpha IIb \beta 3$) levando à formação de agregados células tumorais-fibrina-plaquetas (Koizume & Miyagi, 2014; Van Es et al, 2014) – **(Figura 3)**.

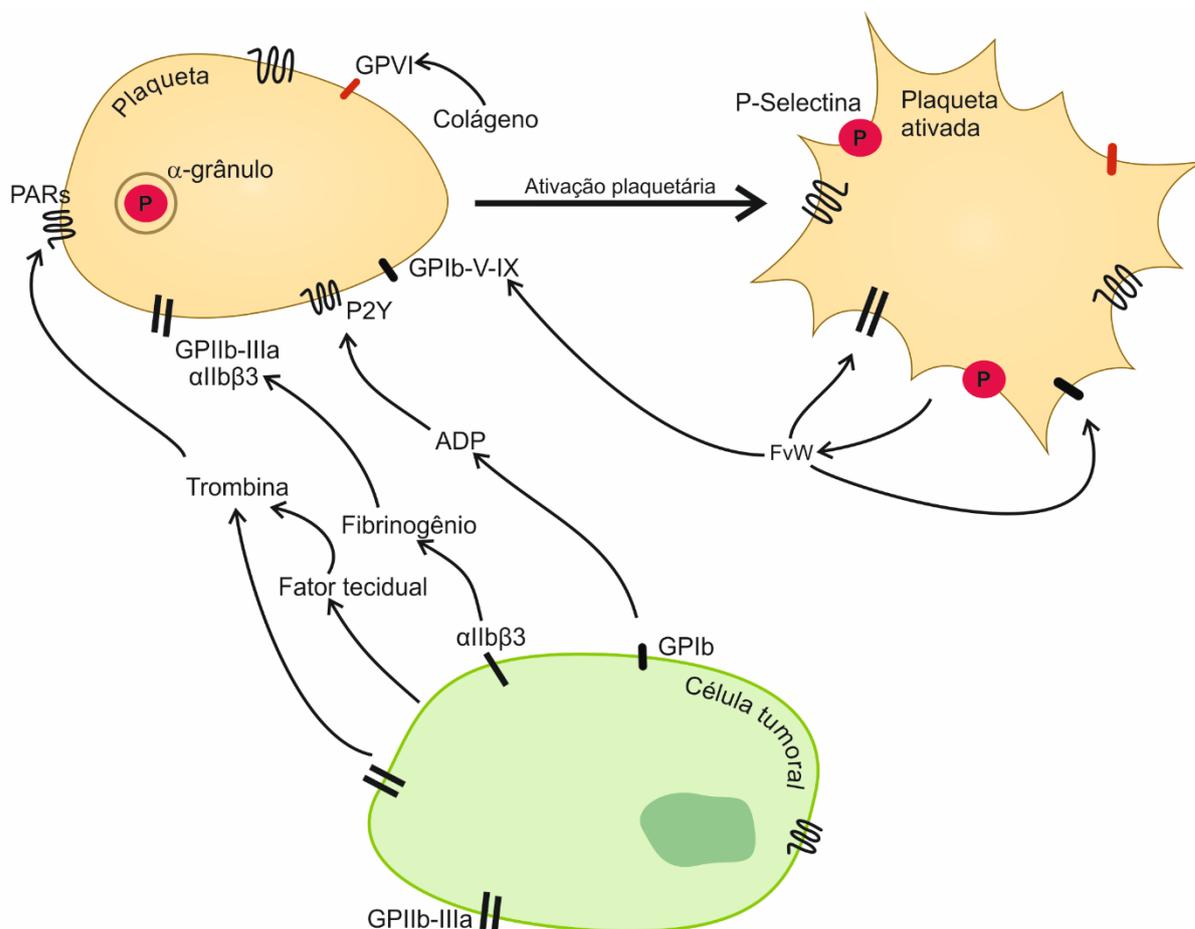


Figura 3. Interação célula tumoral e plaqueta. Células tumorais podem ativar a função plaquetária através da interação direta célula tumoral-plaqueta. O efeito é mimético ao de agonistas, uma vez que proteínas da membrana da célula tumoral podem interagir com glicoproteínas e outros receptores plaquetários e iniciar a cascata de ativação plaquetária. Uma vez que a plaqueta está ativada, ocorre à exposição de P-Selectina, um importante fator de adesão (Adaptado de Bambace & Holmes, 2011).

Além disso, a interação das células tumorais com plaquetas é mediada por moléculas de adesão, principalmente as selectinas. Selectinas são glicoproteínas localizadas em membranas que se ligam especificamente a carboidratos, presentes em diferentes moléculas como glicoproteínas, glicolipídios e glicosaminoglicanos/proteoglicanos. Existem três tipos de selectinas em mamíferos: a P-selectina, encontrada em plaquetas e células endoteliais; a L-selectina, encontrada em leucócitos; e a E-selectina, encontrada em células endoteliais. A interação de selectinas com seus ligantes depende, em parte, de uma estrutura de carboidratos carregados negativamente. Usualmente, a ligação se dá entre a selectina e agregados de um antígeno contendo carboidrato conhecido como sialosil-Lewis x/a. Este antígeno é encontrado em diferentes moléculas e tem sido

considerado um marcador tumoral. Por exemplo, sialosil-Lewis-a é o antígeno reconhecido por CA19-9, que é útil para o acompanhamento clínico de pacientes com tumor de ovário. Além disto, a expressão de antígenos sialosil-Lewis x/a em carcinomas de mama, cólon, próstata, vias biliares, estômago e pulmão é um fator de mau prognóstico. Estes antígenos geralmente se apresentam em glicoproteínas, classificadas como membros da família das mucinas, as quais aumentam a tendência de agregação plaquetária. Desta forma, aumenta-se a probabilidade da formação de um êmbolo misto, constituído de células tumorais e plaquetas, que poderia atuar como “blindagem” das células tumorais e, conseqüentemente, evasão frente ao sistema imune. A P-selectina é essencial para a formação do êmbolo. Foi demonstrado que animais deficientes em P-selectina apresentaram menor propensão à progressão de carcinomas de cólon e que a disfunção plaquetária estava associada com menor propensão de metástases (Khorana, 2003; Gil-Bernabé et al, 2013; Coupland & Parish, 2014).

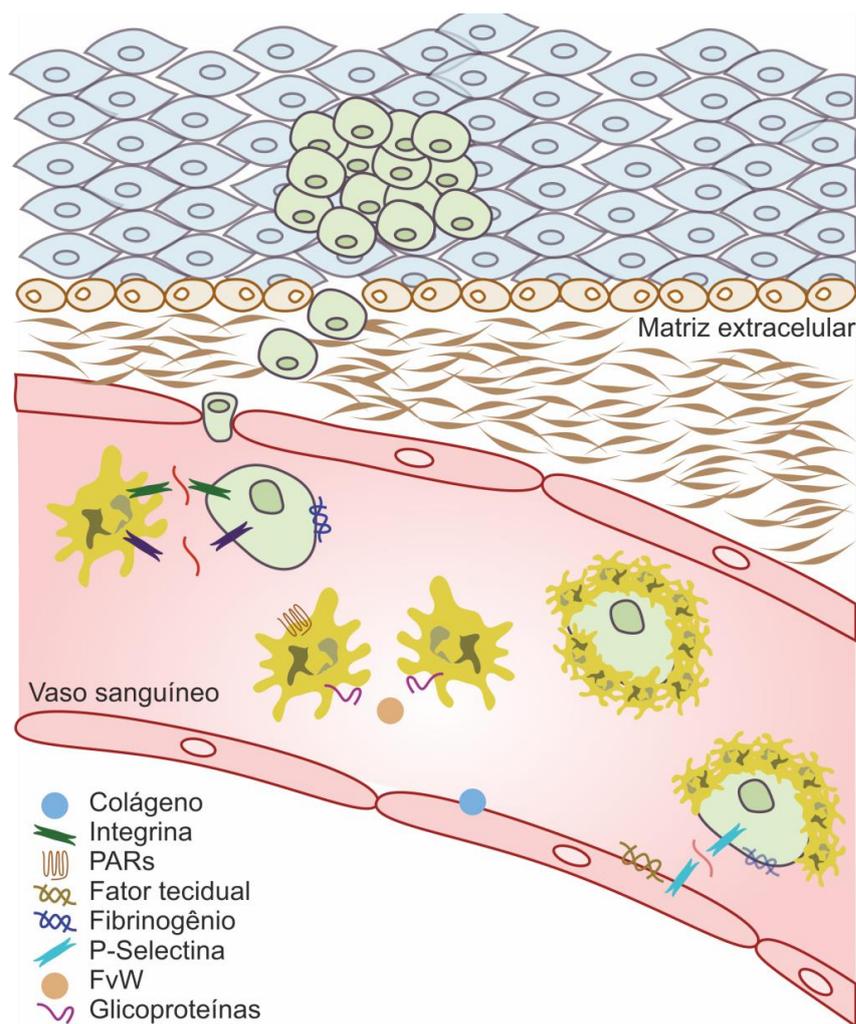


Figura 4. Interação de células tumorais e plaquetas na circulação sanguínea. Diversas células tumorais podem ser liberadas pelo tumor na circulação sanguínea, mas somente algumas obtêm sucesso no processo de colonização metastática. A formação de um êmbolo misto (célula tumoral-plaqueta) auxilia na proteção da célula tumoral frente ao fluxo hemodinâmico e sistema imune.

A terapia com agentes inibidores de ativação plaquetária em câncer foi sugerida em 1989 por Zacharski e colaboradores como alternativa para inibir metástase. Sendo assim, a investigação de potentes candidatos a inibidores da ativação e agregação plaquetária se faz necessária (Bambace & Holmes, 2011). Agonistas fisiológicos que promovem ativação plaquetária e amplificam essa resposta são utilizados como ferramentas para elucidar mecanismo de ação de pequenas moléculas como antiagregantes e antimetastáticos. Dentre os agonistas temos: *ADP* (interage com receptores específicos [P2Y₁₂ e P2Y₁] e glicoproteínas IIb-IIIa [i.e. Integrina α2β3]); *colágeno* (interage com receptores de glicoproteínas Ia-IIa [integrina α1β2] e VI [GPIV]; também pode ser utilizado para monitorar a inibição

de ciclooxigenase e avaliar a via da fosfolipase C); *trombina* (é um agonista utilizado principalmente com plaqueta lavada, uma vez que a exposição de fosfolípidios de membrana forma uma superfície negativa e regula o processo de coagulação via formação de trombina; a resposta à trombina permite também investigar a ocorrência da secreção de grânulos); *adrenalina* (a agregação estimulada por adrenalina também é dependente de integrina $\alpha 2\beta 3$, no entanto, adrenalina interage com receptores α -adrenérgicos); e *ristocetina* (um antibiótico que atua como cofator da ligação de Fator de von Willebrand (FvW) plasmático e glicoproteína Ib [GPIb] plaquetário. A resposta plaquetária frente a ristocetina mostra ausência ou deficiência de interação de glicoproteína GPIb-IX e FvW) (Bambace & Holmes, 2011; Ministério da Saúde, 2012; Oliveira et al, 2013).

1.4. Proteínas tirosina fosfatases

As vias de transdução de sinais são essenciais para que células possam responder, de forma transiente, aos diversos estímulos do microambiente. Para tal, é necessário que mediadores das cascatas de sinalização sejam regulados através de modificações pós-tradução de proteínas. Dentre as diferentes modificações pós-tradução, a fosforilação/desfosforilação é a principal forma de modulação covalente rápida e reversível de proteínas (Tamura et al, 2004; Jailkhani et al, 2011). O grupamento fosfato em resíduos específicos de aminoácidos de uma proteína pode “criar” um novo sítio de reconhecimento para interações proteína-proteína, controlar a estabilidade proteica e, mais importante, pode regular a atividade enzimática. Desta forma, a fosforilação de resíduos de tirosina, serina e treonina, mediada pelo balanço entre a ação de proteínas quinases (PKs, do inglês *protein kinase*) e proteínas fosfatases (PPs, do inglês *protein phosphatase*) é reconhecida como fator crucial na geração e regulação de sinais necessários para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular (Jailkhani et al, 2011). Nesse contexto, mudanças anormais na atividade dessas enzimas podem proporcionar consequências graves que incluem diabetes, obesidade, inflamação, doenças imunológicas, neurodegenerativas e neoplasias (Mustelin et al, 2005; Ferreira et al, 2006; Souza et al, 2009; Jailkhani et al, 2011; Lee et al, 2015; Ferreira et al, 2019).

Com base na função, estrutura, sequência, especificidade, sensibilidade a ativadores e inibidores, as PPs podem ser divididas em duas grandes famílias: serina/treonina fosfatases e tirosina fosfatases (PTPs, do inglês *protein tyrosine*

phosphatase) - (Aoyama et al, 2003; Ferreira et al, 2006). No genoma humano já foram identificados 107 genes que codificam enzimas da família das PTPs (Mustelin et al, 2005; Alonso et al, 2004; Souza et al, 2009; Caselli et al, 2016). Em relação à função, estrutura, sequência de aminoácidos e resíduos de aminoácidos presentes em seus domínios catalíticos, as PTPs podem ser divididas em quatro subfamílias: PTPs da classe I, classe II, classe III e classe IV. Nesta tese, foi enfatizado às proteínas tirosina fosfatases de baixo peso molecular (LMWPTP, do inglês *low molecular weight protein tyrosine phosphatase*) e proteína tirosina fosfatases 1B (PTP1B, do inglês *protein tyrosine phosphatase 1B*).

1.4.1. Proteínas tirosina fosfatases (LMWPTP e PTP1B) no câncer

Até poucos anos atrás fosfatases eram sido consideradas como supressores de tumor, entretanto têm surgido evidências para o papel de alguns membros da família PTP na iniciação de vários tipos de cânceres (Zhao et al, 2015).

LMWPTP constitui um grupo de enzimas tirosina específicas de 18 kDa (pertencentes à classe II), também conhecidas como *acid phosphatase* (ACP)1, amplamente expressas em diferentes tecidos. Em humanos, essas enzimas são codificadas por uma única cópia do gene *ACP1*, localizado no cromossomo 2, cuja transcrição origina quatro diferentes RNAs mensageiros através de um complexo sistema de *splicing* alternativo. Das quatro isoformas de LMWPTPs apenas duas, isoforma (IF) 1 e 2, demonstram ser cataliticamente ativas, exercendo funções até o momento consideradas como idênticas (Modesti et al, 1998; Souza et al, 2009). LMWPTP influencia a fosforilação de mediadores de vias de sinalização envolvidas no câncer e, portanto, se postula tratar de uma enzima promotora de tumor. Estudos mostram que o aumento na expressão de LMWPTPs é suficiente para induzir a transformação celular e que a atividade dessas enzimas está fortemente correlacionada ao desenvolvimento e progressão de tumores em modelos animais. De fato, análises de tumores humanos têm revelado alta prevalência da forma desfosforilada e oncogênica do receptor EphrinA2, o que tem sido associado ao aumento da expressão de LMWPTPs (Kikawa et al, 2002; Chiarugi et al, 2004; Locard-Paulet et al, 2016). Malentacchi e colaboradores (2005) avaliaram os níveis de expressão de LMWPTPs em amostras de tumores de mama, cólon, pulmão e em neuroblastoma. Os resultados mostraram aumento na expressão de LMWPTPs na maioria das amostras analisadas, indicando também a existência de significante

correlação entre os níveis de expressão de LMWPTPs como principais características clínico-patológicas comuns de cada tipo de câncer. Adicionalmente, o aumento na expressão de LMWPTPs demonstrou ser indicativo de prognóstico menos favorável, constituindo marcador da agressividade tumoral (Malentacchi et al, 2005; Souza et al, 2009; Ruela-de-Sousa et al, 2016). Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a demonstrar que a inibição da LMWPTP torna as células leucêmicas, anteriormente resistentes, sensíveis a quimioterápicos (Ferreira et al, 2006; Ferreira et al, 2012). Além disso, demonstramos que células de leucemia mieloide crônica humana (K562) transfectadas com o gene da LMWPTP se tornaram menos sensíveis ao tratamento com vincristina, em relação às células não transfectadas (Ferreira et al, 2012). Reportamos também que a LMWPTP, nas células leucêmicas resistentes, é crucial para a manutenção da atividade das proteínas quinases Src e Bcr-Abl e, conseqüentemente, manter a agressividade destas células (Ferreira et al, 2012). Mas recentemente, reportamos que a LMWPTP contribui para a manutenção do efeito *Warburg* em células da leucemia mieloide crônica resistente a quimioterápicos, fato que também fornece vantagem metabólica a estas células para a resposta contra estresse oxidativo (Faria et al, 2017; Faria et al, 2020).

Apesar das evidências sobre a LMWPTP atuar como promotora de tumores, até então não havia evidências clínicas, nem mecanismo de ação convincente para o papel desta enzima no desenvolvimento e progressão tumoral. Portanto, realizamos dois estudos em parceria com o grupo do Prof. Maikel Peppelenbosch envolvendo pacientes com CRC e próstata (Hoekstra et al, 2015; Ruela-de-Sousa et al, 2016). Em ambos os estudos, foi observado que o aumento da expressão da LMWPTP se correlaciona com a malignidade destes tumores, sugerindo que esta enzima tem um grande potencial como biomarcador preditivo do estágio de desenvolvimento da doença e prognóstico. Ademais, especificamente no CRC, analisamos a expressão da LMWPTP (em nível proteico) em biópsias de pacientes classificadas como de baixo grau de displasia, alto grau de displasia, adenocarcinoma e grupo controle. De forma interessante, observamos que a expressão da LMWPTP aumentou de forma significativa com o aumento da gravidade da doença. Além disso, deve-se destacar que a expressão desta enzima se manteve alta em células de CRC que metastizaram para o fígado (Hoekstra et al, 2015).

A PTP1B tem função bem estabelecida no metabolismo através da regulação da fosforilação dos receptores de insulina. De fato, aumento de expressão de PTP1B está associado à obesidade, bem como inibidores para essa proteína são estudados como potenciais fármacos para uso em diabetes do tipo 2 (Lessard et al, 2010). Além disso, a PTP1B está associada a mau prognóstico e perfil invasivo em câncer colorretal (Chen et al, 2014; Hoekstra et al, 2016), proliferação e metástase em câncer de pulmão (Liu et al, 2015), resistência a morte por anoikis (quando há perda de adesão celular, importante para o processo de migração) em câncer de mama (Hilmarsdottir et al, 2017), e diretamente associada a malignidade em câncer de próstata, estômago e ovário (Wang et al, 2012; Wang et al, 2018). Os mecanismos pelos quais PTP1B promove agressividade tumoral envolvem a participação de quinases como FAK, Src e Erk (MAPK), em que aumento de atividade dessas proteínas estão diretamente relacionados à proliferação e migração celular (Wang et al, 2012; Liu et al, 2015).

No contexto de sinalização intra-plaquetária, o estudo de fosfatases (incluindo as proteínas tirosina fosfatases) não é tão aprofundado quanto em outras doenças, como câncer e doenças metabólicas. A presença de LMWPTP em plaquetas foi descrita pela primeira vez em 2007, em que se sugeriu que a atividade positiva de LMWPTP estaria relacionada à diminuição de função plaquetária. Entretanto, nenhuma avaliação de função plaquetária foi realizada nesse estudo de Mancini e colaboradores, 2007 - (Mancini et al, 2007). Por outro lado, a PTP1B foi descrita como importante mediador da sinalização positiva de eventos de adesão, o qual é fundamental para função plaquetária. Sendo assim, a investigação molecular aprofundada dessas fosfatases poderia impulsionar o desenvolvimento de compostos que atuam nessas enzimas, como alvo terapêutico (Ragab et al, 2003; Arias-Salgado et al, 2005; Mori et al, 2012).

Diante dessas evidências acreditamos que a LMWPTP apresenta um grande potencial como alvo para a investigação sobre metástase em câncer gastrointestinal, ao considerar o contexto da primeira etapa da disseminação hematogênica (interação células tumorais-plaquetas).

1.5. 3-bromopiruvato

3-bromopiruvato (3BP) é um análogo do piruvato e atua como agente alquilante cujo mecanismo químico proposto é uma substituição nucleofílica através do mecanismo de substituição nucleofílica 2 com grupo(s) tiol(ois) nucleofílico(s). Com a clivagem do bromo (grupo abandonador), um centro alquilante (eletrofílico) é exposto a alvos nucleofílicos, como por exemplo, os grupos tiol (-SH) de proteínas. Enzimas do metabolismo energético como hexoquinase, enzima málica, glutamato desidrogenase, piruvato desidrogenase, succinato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato quinase e enzimas mitocondriais geralmente apresentam grupos tiois em sua estrutura. Desta forma, o 3BP causa um grande impacto no metabolismo energético e consequente morte celular. Células tumorais apresentam elevado consumo de glicose devido à demanda energética para proliferação, e fornecimento de substratos a partir de intermediários do metabolismo de glicose e ciclo de Krebs para síntese de biomoléculas. Sendo assim, muitas células tumorais são sensíveis ao 3BP (Nilsson et al, 2015; Jardim-Messeder & Moreira-Pacheco, 2016). No entanto, o alvo, bem como os efeitos do 3BP no metabolismo oxidativo, depende da disponibilidade e tipo de nutrientes (Pereira da Silva et al, 2009). Uma vez que o 3BP apresenta potente ação antitumoral e a baixa toxicidade na maioria das células normais, estudos clínicos foram estimulados como, por exemplo, foi demonstrado que o 3BP é eficaz no tratamento de carcinoma hepatocelular fibrolamelar (Ko et al, 2012; Azevedo-Silva et al, 2015). Apesar dos mecanismos de ação do 3BP como agente antitumoral estarem bem descritos na literatura (Azevedo-Silva et al, 2016; Lis et al, 2016), o uso desse composto na resposta plaquetária é um ponto de investigação inédito. O mecanismo de ação do 3BP frente a enzimas do metabolismo de glicose também aponta para o potencial antiagregante desse composto. Tison e colaboradores (1983) reportaram que inibidores da glicólise afetam função plaquetária, ao diminuir agregação frente à agonistas como ADP, adrenalina e colágeno (Tison et al, 1983; Ravi et al, 2015).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Elucidar os mecanismos moleculares da interação de células tumorais e plaquetas, no nível de sinalização celular, de maneira a diminuir a migração e proliferação de células tumorais em câncer colorretal (CRC) e disseminação hematogênica, com foco em proteínas tirosina fosfatases.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1.** Avaliar os efeitos do 3-bromopiruvato na função plaquetária em indivíduos saudáveis e pacientes com câncer gastrointestinal, a fim de compreender os mecanismos moleculares (e potenciais alvos terapêuticos) que coordenam a hiper-reatividade plaquetária *in vitro* e *ex vivo*, frente à exposição com diversos agonistas e a interação de células tumorais e plaquetas.
- 2.2.2.** Investigar a contribuição de LMWPTP em células tumorais frente a alterações morfológicas na presença de plaquetas, com foco em eventos de migração e proliferação celular;
- 2.2.3.** Elucidar LMWPTP como assinatura biológica em tumores gastrointestinais a partir da análise de bioinformática (dados de repositórios públicos) e investigação em biópsias de pacientes.

3. Materiais e métodos

3.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, BR) e The Global Bioresource Center (ATCC, EUA). Detalhes das linhagens celulares na Tabela 2.

3.2. Reagentes e anticorpos

Reagentes foram adquiridos de Sigma Aldrich (MO, EUA), Santa Cruz, Merck Millipore (MA, EUA), Chronolog (PA, EUA). Para detalhes dos compostos utilizados para o tratamento de plaquetas, verificar a Tabela 1.

Anticorpos foram adquiridos de Santa Cruz Biotech. (TX, EUA), Cell Signaling Technology (MA, EUA), Signal Way Antibodies (MD, EUA). Para mais detalhes, verificar Tabela 4.

Tabela 1. Compostos utilizados para tratamento de plaquetas.

Reagente	Companhia	Código
3-bromopiruvato	Sigma Aldrich	16490-10
PP2	Sigma Aldrich	P0042
CinnGel	Santa Cruz	205633
NSC87887	Merck Millipore	565851
Colágeno	Chronolog	385
Ristocetina	Chronolog	396

3.3. Cultura de células

O cultivo das linhagens celulares de CRC *wild type* e silenciadas para LMWPTP foi realizado em meio de cultura indicado pelo BCRJ (Tabela 2 e 3), nos quais foi adicionado 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de sulfato de estreptomicina e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas em atmosfera umidificada, 5% CO₂ a 37°C.

Tabela 2. Informações sobre linhagens celulares

<i>Linhagem</i>	HCT116	HT29	Caco-2	T84
<i>Paciente</i>	Homem, 48 anos	Mulher, 44 anos	Homem, 72 anos	Homem, 72 anos
<i>Órgão</i>	Cólon ascendente	Cólon	Cólon	Cólon, derivado de pulmão
<i>Doença</i>	Carcinoma colorretal	Adenocarcinoma colorretal	Adenocarcinoma colorretal	Carcinoma colorretal
<i>Estágio</i>	Dukes' D	Dukes' C		
<i>Derivado de</i>	Tumor primário	Tumor primário		Tumor secundário
<i>MSI status</i>	MSI	MSS	MSS	MSS
<i>CIMP painel 1</i>	+	+	+	∅
<i>CIMP painel 2</i>	+	+	-	∅
<i>CIN</i>	-	+	+	∅
<i>KRAS</i>	G13D	WT	WT	G13D
<i>BRAF</i>	WT	V600E	WT	WT
<i>PIK3CA</i>	H1047R	P449T	WT	G542L
<i>PTEN</i>	WT	WT	WT	WT
<i>TP53</i>	WT	R273H	E204X	WT
<i>Meio de cultivo</i>	McCoy5A	McCoy5A	DMEM	DMEM

(Ahmed et al, 2013; Brattain et al, 1981a; Brattain et al, 1981b; Eshleman et al, 1995; Fogh et al, 1977; Liu et al, 2006; Griffin et al, 2011; Takawa et al, 2011; Mouradov et al, 2014).

Tabela 3. Linhagens celulares silenciadas

Linhagem	Técnica silenciamento	Obtenção	Meio de cultivo
HT29 LMWPTP KD	CRISPR	Dr. Fuhler	DMEM
HCT116 shLWMPTP	Lentivírus	Hoekstra et al, 2015	DMEM

3.4. Oncomine™ e GEOdata

Dados de transcriptoma disponíveis em repositórios públicos foram analisados para validação das hipóteses frente à análise de imunohistoquímica. Análise em Oncomine™ e GEOdataset foi feita conforme descrito anteriormente (Hoekstra et al, 2015). A partir da busca por gene *ACP1* comparando dados de tecido de câncer e normal, o perfil de expressão público disponível em Oncomine™ (Analysis type; Cancer vs. Normal Analysis; Esophageal or Gastric or CRC) e GEO profiles foram avaliados de acordo com a apresentação formal de Oncomine™ e análise de

transcritos disponíveis em GEO Profiles. Os GEO Datasets que foram avaliados para estômago: GEO Dataset Record GSE13861 (transcript 201629_s_at) comparou 71 amostras de tecido de câncer de estômago com 19 tecidos normais de estômago [Illumina HumanWG-6 v3.0 expression beadchip (Illumina, Inc., California, USA)], (Cutcutache et al, 2016), GSE35809 (transcript U25849_at) comparou 3 amostras de tecido de câncer de estômago com 10 tecidos normais de estômago [GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, California, USA)], (Shi et al, 2017), GSE2685 (transcript 201630_s_at) comparou 22 amostras de tecido de câncer de estômago com 8 tecidos normais de estômago [GeneChip HuGeneFL array; Affymetrix, California, USA)], (Hippo et al, 2002). Para CRC, foram avaliados 33 dados públicos disponíveis em Oncomine e GEO Dataset Record (transcript 201630_s_at) comparou 34 amostras de tecido de CRC com 15 tecidos normais de cólon [GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, California, USA)], (Alhopuro et al, 2012).

3.5. Imunohistoquímica

Imunohistoquímica foi realizado conforme descrito anteriormente (Hoekstra et al, 2015). Cortes histológicos de 5µm fixados em parafina-formalina (FFPE) foram desparafinizados em xileno e reidratados em diferentes porcentagens de álcool. O reestabelecimento de antígenos foi feito em tampão citrate (pH 6.0) a 95°C por 15 minutos. As peroxidases endógenas foram bloqueadas através da imersão dos *slides* em peróxido de hidrogênio (3%-PBS). Em seguida, foi feito o bloqueio através da incubação em goat sérum (10%-PBS) por 1 hora em temperatura ambiente. Anticorpo primário ACP1/LMWPTP (1:100 em 5% BSA-PBS) e PTP1B (1:50 em 5% BSA-PBS) foi incubado *overnight* a 4°C. Anticorpo secundário goat anti-mouse-HRP (Dako, Bélgica) foi incubado por 1 hora. E a marcação com hematoxilina-eosina foi feita por 3 minutos. As imagens foram adquiridas em microscópio Nikon (Nikon Inc., Japão) e a contagem de células positivas bem como a intensidade de marcação foi feita pelo sistema (Allred et al, 1998).

3.6. Dosagem de MTT

As células CRC foram plaqueadas na densidade de 1.5×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 48 horas. Em seguida, a capacidade de redução do MTT pelas células foi analisada, para isso o meio foi removido e

adicionado aos poços meio sem soro contendo MTT (0.5 mg/mL). Após incubação por 3 horas a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 100µL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em espectrofotômetro (ELx 800 BIO-TEK) em $\lambda = 570\text{nm}$. Os valores no gráfico foram expressos em absorbância. Para plaquetas, ensaio de MTT foi realizado conforme descrito anteriormente (Shiri et al, 2014). Resumidamente, PRP foi plaqueado e tratado em placas de 96-poços por 3 horas (volume total por poço 180µL). 20µL de MTT (Sigma Aldrich, EUA) em solução (5mg/mL em PBS) foram adicionados por poço. Após incubação por 4 horas a 37°C, a placa foi centrifugada a 2500rpm, 10 minutos, e a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan formados foram solubilizados em 100µL de etanol. A absorbância foi medida em $\lambda = 585\text{nm}$ com leitor de placas (BioRad, EUA).

3.7. Preparação de plaquetas

Após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido [Ethical Committee Project NL66029.078.18 aprovado pelo Comitê de Ética da Erasmus Medical Center (Anexo 3)], sangue total de indivíduos saudáveis ($n=19$) e pacientes com câncer gastrointestinal ($n=6$) foram coletados em tubos plásticos contendo 3.8% de citrato trissódico (v/v). Sangue total foi centrifugado a 1500rpm, 10 minutos, 22°C, e Plasma Rico em Plaquetas (PRP) foi coletado. Para obtenção de Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), após coleta de PRP, o restante do material foi centrifugado a 2500rpm, 10 minutos, 22°C, e sobrenadante foi coletado e utilizado na agregação plaquetária por meio óptico. Para análises específicas, foi utilizado NaCl (0.9%) para lavagem de plaquetas conforme descrito anteriormente (Andrade et al, 2016). Todos os experimentos foram realizados usando a concentração de $20\text{-}30 \times 10^4$ plaquetas/µL.

3.8. Informação dos pacientes

Sangue total foi coletado de três pacientes com neoplasia maligna esofágica e colorretal. A média de idade dos pacientes é 73 ± 10 anos, sendo quatro homens e duas mulheres. Dois pacientes faziam uso de salbutamol, dois pacientes faziam uso de moduladores de pH gástrico (Esomeprasol e Famotidina), e dois pacientes faziam uso de fármaco anti-diabete (Hidroclorotiazida). Um paciente fazia uso de paracetamol, e outro fazia uso de metoclopramida e beclometazona. Nenhum dos

fármacos listados acima apresenta efeito antiplaquetário conforme brochura da Chronolog (Chronolog Corp., EUA). Todos os pacientes foram analisados aos pares com indivíduos sadios do mesmo gênero.

3.9. Agregação plaquetária por método óptico

Uma alíquota de 500 μ L de PRP foi plaqueada em cubetas específicas de agregômetro e incubadas a 37°C por 5 minutos (fase pré-teste) na ausência ou presença de compostos (100 μ M 3-Bromopiruvato, 10 μ M CinnGel, 100 μ M NSC87887). Em seguida, durante a fase de teste e aquisição de dado, foi adicionado colágeno (2 μ g/mL) as amostras, com uso de PPP como baseline. A curva de agregação foi monitorada por 10 minutos após adição do agonista em agregômetro Chronolog (Chronolog Corp., EUA), seguindo descrição metodológica (Born & Cross, 1963). A porcentagem de agregação foi considerada o parâmetro de análise (**Figura 5**).

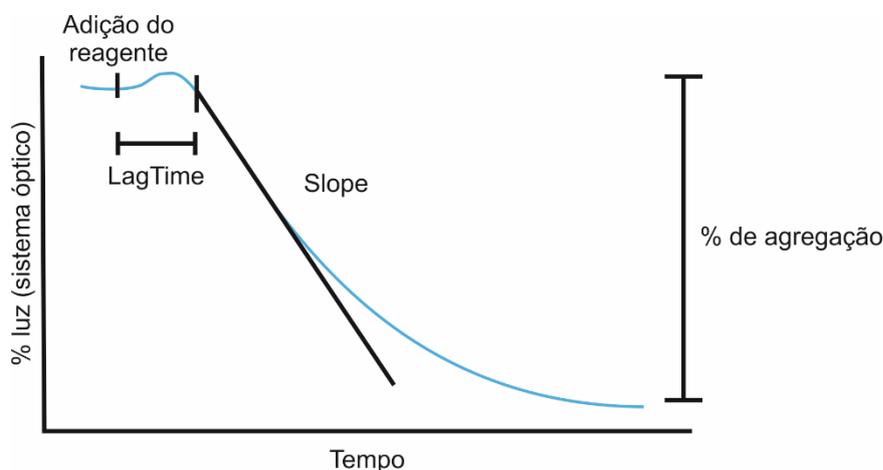


Figura 5. Parâmetros avaliados em agregação plaquetária por sistema óptico. Após a adição do reagente, o tempo até a resposta de agregação ocorrer é denominado *LagTime*. O *Slope* é o parâmetro que avalia a intensidade da resposta frente ao agonista a partir do ângulo de decaimento da curva. A porcentagem de agregação refere-se à formação do agregado na cubeta (Silver et al, 1993).

3.10. Citometria de fluxo com plaquetas

Plaquetas lavadas foram incubadas com compostos 3BP (100 μ M); CinnGEL (10 μ M); e NSC87887 (100 μ M), por 60 minutos a temperatura ambiente, seguida de estímulo com colágeno (2 μ g/mL) ou ristocetina (1.25mg/mL) por 10 minutos). Após o tratamento, as amostras foram incubadas com anticorpos CD41b (92800/040408 M1674); CD42b (65117/151106-M1729); CD62 (AK4) (304910-B239360 Becton,

Dickinson and Company, EUA) por 15 minutos e a citometria de fluxo foi realizada em MACSQuant[®] Analyzer 10 (EUA) e análise feita em FlowJo, LLC v10 (EUA).

3.11. Interação célula tumoral e plaquetas

Para experimentos de co-cultura, células CRC foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de $(1.0 \times 10^4 \text{ células/cm}^2)$ por 24 horas. Em seguida, células foram lavadas com PBS, e foi adicionado PRP em cada poço na ausência ou presença de colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$), 3BP ($100 \mu\text{M}$), e incubadas por 6 horas. Após período de co-cultura, as imagens foram obtidas em microscópio (Nikon Inc, Japão) e plaquetas foram removidas e analisadas por western blot, conforme descrito anteriormente (Alves et al, 2015).

Para avaliação do efeito de meio condicionado em plaquetas, o meio de cultura foi condicionado por 24 horas na presença das células tumorais. Após 24 horas, o meio sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1500rpm, por 5 minutos, 22°C . O PRP foi tratado com meio condicionado por 6 horas e as plaquetas foram removidas e analisadas por western blot.

Para o ensaio de formação de trombo, células CRC foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA) e lavadas 3 vezes com NaCl (0.9%), para remover o excesso de tripsina. 500 μL de PRP foi incubado com células tumorais na densidade de $1.5 \times 10^4 \text{ células/teste}$ (protocolo escrito por Medina et al, 2006 com modificações) a 37°C por 5 minutos em fase pré-teste na ausência ou presença de $100 \mu\text{M}$ 3BP. Em seguida, no início da fase de teste e aquisição de dado, foi adicionado colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$) nas amostras. A curva de agregação foi monitorada por 10 minutos após adição do agonista em agregômetro Chronolog (Chronolog Corp., EUA), seguindo descrição metodológica (Born & Cross, 1963). A porcentagem de agregação foi considerada o parâmetro de análise.

3.12. Western Blot

Células CRC foram plaqueadas em placas de petri 100mm, na densidade de $5.0 \times 10^4 \text{ células/cm}^2$ para HT29, e $4.5 \times 10^4 \text{ células/cm}^2$ para HCT116 por 24 horas. Após esse período, as células foram submetidas à extração proteica com tampão de lise apropriado contendo inibidores de proteases [Tris-HCl 50 mmol/L pH7.4; Tween 20 1%; SDS 0.25%; NaCl 150 mmol/L ; EGTA 1 mmol/L ; ortovanadato 1 mmol/L ; NaF 1 mmol/L ; aprotinina $1 \mu\text{g/mL}$; leupeptina $10 \mu\text{g/mL}$; PMSF 1 mmol/L]. As amostras

foram sonicadas e incubadas em banho de gelo por 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000rpm por 10 minutos. A quantificação proteica foi realizada por espectrofotometria pelo método de Bradford, utilizando kit comercial (Sigma-Aldrich, EUA) e albumina como padrão para as amostras de extrato total. As amostras foram incubadas à 95°C por 5 minutos em tampão de amostra na proporção de 1:1 [Tris-HCl pH6.8 100mmol/L; azul de bromofenol 0.1%, Na₂HPO₂ 1mol/L, glicerol 20%, SDS 4%, DTT 200mmol/L]. Para a corrida eletroforética foi utilizado gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4mmol/L, SDS2%, Tris-HCl pH6.8 750mmol/L) e gel de resolução (EDTA 4mmol/L, SDS 2%, Tris-HCl pH8.8 50mmol/L). A corrida foi realizada a 120V por aproximadamente 1.5 horas. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (previamente incubadas em metanol) durante 2 horas a 400mA. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com Odyssey[®] Blocking Buffer por 1 hora. As proteínas avaliadas foram detectadas na membrana por incubação *overnight*, com anticorpo primário específico (Tabela 4). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T (TBS; 0.05% Tween 20) - (3 vezes, 5 minutos) e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase-HRP (diluição 1:10000). Após este período, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3 vezes, 5 minutos). O fotodocumentador utilizado foi Odyssey[®] (LI-COR Biosciences, EUA) e análise realizada em ImageLite[®] (LI-COR Biosciences, EUA).

Tabela 4. Anticorpos usados em ensaio de western blot e microscopia

Anticorpos	Resíduo fosforilado	Companhia	Código
Acp1 α/β		Santa Cruz Biotech.	sc-100343
PTP1B		Santa Cruz Biotech.	sc-14021
β -actina		Santa Cruz Biotech.	sc-47778
p-Src family (Y416)	Ativador	Cell Signaling	2101
p-Src (Y572)	Inibitório	Cell Signaling	2105
Src		Cell Signaling	2123
p-FAK (Y925)	Ativador	SignalWay Antibodies	11123-2
FAK		Cell Signaling	3285S
p-Integrin β III (Y773)	Ativador	SignalWay Antibodies	11060-1
p-Erk (T202/Y204)	Ativador	Cell Signaling	4370
Erk		Cell Signaling	4695 (137F5)
p-p38 (T180/Y182)	Ativador	Cell Signaling	4511
p38		Cell Signaling	9228

Caspase-3		Cell Signaling	9662
Cleaved Caspase-8		Cell Signaling	9496
Bax		Cell Signaling	2772
Bcl-2		Cell Signaling	2876
α -tubulina		Cell Signaling	2125

3.13. Imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi realizada conforme descrito anteriormente (Ferreira et al, 2012). Brevemente, células foram lisadas com 100 μ L de Tampão de Lise (HEPES pH7.4 20mM, MgCl₂ 2.5mM, EDTA 0.1mM) em banho de gelo por 2 horas. Após centrifugação, seguiu-se a etapa de limpeza com adição de *G-Sepharose beads* (Thermo Scientific, EUA) aos extratos proteicos. Em seguida, apenas o lisado proteico foi incubado *overnight* a 4°C sob agitação com anticorpos para LMWPTP (informações consultar Tabela 1). *G-Sepharose beads* foram adicionadas ao lisado e as amostras foram incubadas por 3 horas a 4°C sob agitação. As beads foram lavadas 3 vezes com tampão acetato (100mM) antes do ensaio de atividade de fosfatases. Para ensaio de atividade de fosfatase, foi realizada a quantificação proteica dos extratos celulares e normalizadas as amostras a 100 μ g/ μ L.

3.14. Atividade de fosfatases

Após imunoprecipitação, as *beads* foram ressuspendidas em tampão acetato e a atividade enzimática foi medida conforme: meio de reação (100 μ L) com tampão acetato 100mM, pNPP 5mM e fosfatases precipitadas. Após 60 minutos a 37°C e sob agitação (600rpm), a reação foi finalizada com 100 μ L de NaOH 1M. A absorbância foi medida a 405nm (espectrofotômetro BioRad, EUA).

O efeito de 3-Bromopiruvato em LMWPTP foi examinado a partir do tratamento das células HT29 com 70 μ M de 3BP (IC₅₀) por 24 horas e a enzima precipitada após tratamento.

3.15. Ensaio de formação de colônia

Células CRC foram plaqueadas na densidade de 2.0x10³ células/poço em placa de 6-poços por 24 horas. Após esse período, 250 μ L de meio de cultura (com SFB), PRP ou PPP foi adicionado em cada poço correspondente. As imagens de microscopia foram adquiridas utilizando microscópio Nikon (Nikon Inc, Japão) e EVOS Cell

Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.16. Microscopia confocal

HT29 foi cultivada a 5.0×10^4 células/poço – 500 μ L, e HCT116 foi cultivada a 4.5×10^4 células/poço – 500 μ L, em lamínulas por 24 horas. Após esse período, as células foram incubadas com meio de cultura (com SFB) e com meio de cultura com plaquetas (a 5%, em meio sem SFB) e cultivadas por 24 horas. Depois, células foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 10 minutos, lavadas 3 vezes com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 (0.01%-PBS) por 10 minutos, e bloqueadas com BSA (3%-PBS) por 1 hora. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas overnight 4°C em câmara umidificada com anticorpos primários em BSA (1%-PBS) – (ver Tabela 1). As lamínulas foram incubadas com anticorpos secundários Alexa-Fluor® Invitrogen 488 Mouse (diluição 1:500) - (Thermo Fisher Scientific, EUA) por 1 hora. As lamínulas foram incubadas com DAPI-Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, EUA) a diluição 1:1000. Depois, lamínulas foram montadas em lâminas. As imagens foram adquiridas em LEICA TCS SP5 II confocal microscope (Leica, Alemanha) no LaCTAD – UNICAMP com objetiva de 100X. Formato das imagens 1024x1024 and 4x zoom óptico. Imagens foram analisadas utilizando Image J software (NIH, EUA).

3.17. Modelo de cultura 3D

O protocolo foi baseado em Souza et al, 2010. HCT116 e HT29 foram plaqueadas a 3×10^4 células/poço – 1 mL, em placa de 24 poços e cultivadas em modelo 2D por 24 horas. Na sequência, as células foram incubadas com 60 μ L de NanoShuttle (Nano3D Biosciences, EUA) na proporção de 2 μ L/ 1×10^4 células. Após 24 horas de magnetização, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e enzimaticamente removidas com 350 μ L de tripsina. Para o controle, as células foram ressuspensas com 750 μ L de meio de cultura McCoy 5A e plaqueadas a 1×10^4 células/poço – 100 μ l em placa de 96 poços com superfície repelente. Plaquetas foram ressuspensas com as células e a mistura plaqueada imediatamente. A placa foi incubada em cima de drive magnético, com ímãs correspondentes aos 96 poços (Nano3D Biosciences, Greiner Bio-One, BR) para induzir a formação de esferoide. Após 24 horas, o drive magnético foi removido. As imagens foram adquiridas em microscópio Luma Scope (Etaluma Inc, EUA) em magnificação 10X após 120 horas de remoção do drive magnético. Para a marcação de imunofluorescência, os esferoides foram fixados

com paraformaldeído (4%) por 20 minutos, lavados com PBS, e permeabilizados com Triton X-100 (0,1%-PBS) por 20 minutos e bloqueados com BSA (3%-PBS) por 1 hora. Os esferoides foram lavados 3 vezes com PBS e incubados por 48 horas a 4°C em câmara umidificada com anticorpos primários em BSA (1%-PBS) – (ver tabela 1). Esferoides foram incubados com anticorpos secundários Alexa-Fluor® - Invitrogen 488 Mouse (Thermo Fisher Scientific, EUA) - (diluição 1:500) por 3 horas. Os esferoides foram incubadas com DAPI-Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e ActinGreen (Thermo Fisher Scientific, EUA) a diluição 1:1000 por 1 hora. Depois, lamínulas foram montadas em lâminas. As imagens foram adquiridas em microscópio Luma Scope (Etaluma Inc, Carlsbad, EUA) em magnificação 10X. Imagens foram analisadas utilizando Image J software (NIH, EUA).

3.18. Formação de ferida

HT29 e HCT116 foram plaqueadas na densidade de 1.8×10^5 células por poço em placa de 24 poços e cultivadas por 24 horas. Após esse período, a “ferida” foi feita na monocamada de células utilizando ponteira de 200uL, e as células foram tratadas com FSB (10% - controle) ou PRP (5% - estimulação plaquetária). O fechamento da ferida foi acompanhado por até 72 horas. As imagens foram obtidas utilizando microscópio LumaScope (Etaluma Inc, CA, USA) em 10X de magnificação. Barra de escala referente à 100µm. A análise foi feita por software ImageJ (NIH, EUA) e a área de migração foi quantificada em unidades arbitrárias (A.U., do inglês *arbitrary units*).

3.19. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada utilizando-se teste *t*-student pareado. Para comparação entre grandes grupos, foi utilizada ANOVA (post-test Turkey). Foi adotado o nível de significância $P < 0.05$.

Resultados e Discussão

4.1. 3-Bromopiruvato atua como disruptor da resposta das plaquetas derivadas de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer gastrointestinais e da interação plaquetas-células tumorais

4.1.1. Modulação de proteínas quinases e fosfatases, em plaquetas de indivíduos saudáveis, por 3-bromopiruvato

Assim como em câncer e outras doenças, grande parte da investigação de vias de sinalização em plaquetas tem como principal foco as quinases. Como parte de uma fase exploratória desse trabalho, foram feitos diversos experimentos investigativos frente a comportamento de plaquetas em relação a quinases, fosfatases e ao 3BP. Nesse sentido, foi investigada a influência do 3BP, em tratamento tempo-dependente, na atividade de quinases e nível da fosforilação em resíduo de tirosina (**Figura 6**). A atividade de Src e FAK foi associada ao aumento de função plaquetária (Guidetti et al, 2019), e de fato, observou-se o efeito de 3BP em Src e FAK, promovendo a diminuição da atividade dessas quinases. De forma interessante, o composto também modulou diferentemente, no decorrer do tempo, o perfil global de fosforilação em diversas proteínas, como observado pelo efeito em análise de fosfo-tirosinas.

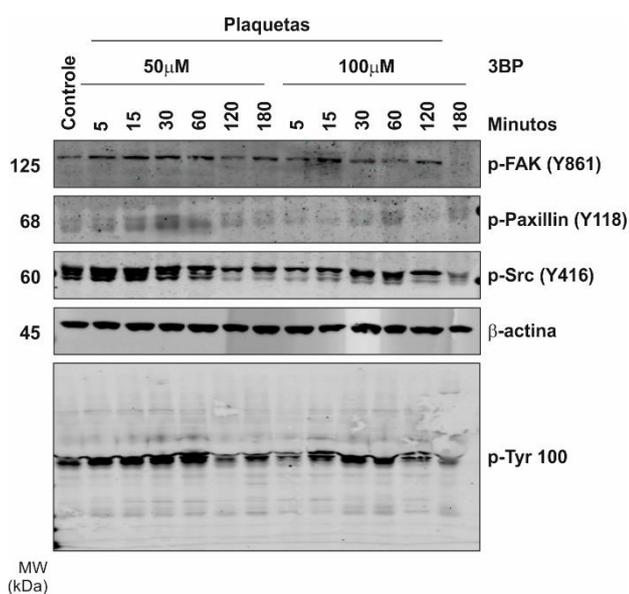


Figura 6. Influência do 3-bromopiruvato na fosforilação de proteínas plaquetárias. *Western blot* das amostras plaquetárias de indivíduos saudáveis tratadas com 3BP, de 0 (controle) até 180 minutos, em duas concentrações de 50 e 100 μ M. β -actina foi utilizada como controle interno.

4.1.2. Proteínas tirosina fosfatases intracelular são diferentemente moduladas pelos agonistas da função plaquetária: colágeno e ristocetina

A relevância das proteínas quinases na função plaquetária tem sido mais explorada que as proteínas tirosina fosfatases, inclusive com algumas quinases apontadas como alvos farmacológicos (Vilahur et al, 2018). Com base no dado mostrado na **Figura 6** que aponta diminuição da atividade de quinases, na etapa seguinte, a atividade global de fosfatases plaquetária foi analisada após estímulo com agonistas: colágeno e trombina (**Figura 7**). Colágeno tem atividade associada a eventos de adesão, enquanto trombina está associada a efeitos de agregação plaquetária (Senis et al, 2014; Ravi et al, 2015). Conforme observamos na **Figura 7**, o colágeno modula positivamente a atividade global de fosfatases, enquanto na presença de trombina se observa uma diminuição da atividade global de fosfatases.

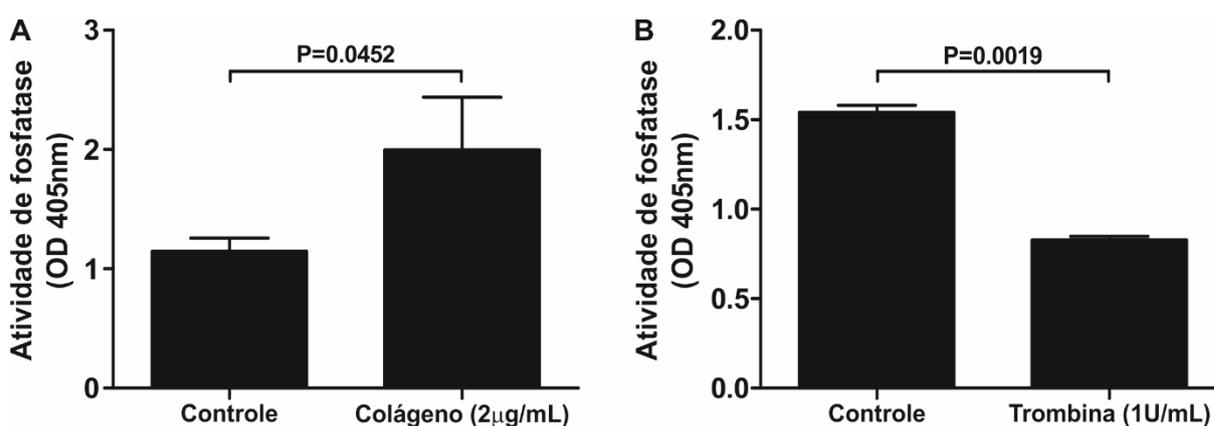


Figura 7. Análise global de fosfatases em plaquetas de indivíduos saudáveis na presença de agonistas. Análise global da atividade de fosfatases através de ensaio colorimétrico com utilização do substrato sintético (pNPP) em plaquetas ativadas por colágeno (A) e trombina (B).

Nesse contexto, considerando a importância da LMWPTP na progressão tumoral, bem como, a importância das plaquetas para a disseminação hematogênica das células tumorais e que a atividade de fosfatase global sobre alteração em resposta aos agonistas, decidimos investigar se a LMWPTP pode ser modulada em virtude da ativação plaquetária por dois agonistas de eventos de adesão: colágeno e ristocetina.

Como mostrado na **Figura 8A**, plaquetas de indivíduos saudáveis apresentam expressão da LMWPTP e também da PTP1B, essa última foi incluída na análise a fim que fosse possível identificar alguma especificidade de ação da LMWPTP, na

função plaquetária. No entanto, o tratamento das plaquetas com colágeno e ristocetina causou diferentes respostas em termos do nível de atividade de ambas as fosfatases. Colágeno provocou um aumento da atividade da LMWPTP e PTP1B (2 e 4 vezes, respectivamente) - (**Figura 8B e C**). Por outro lado, a ristocetina não causou alteração significativa da atividade da LMWPTP e aumento da PTP1B (**Figura 6B e C**). Esses dados indicam que a modulação da LMWPTP em resposta à ativação plaquetária é mais específica para o colágeno, enquanto a PTP1B parece ser mais promíscua, já que responde a ambos agonistas.

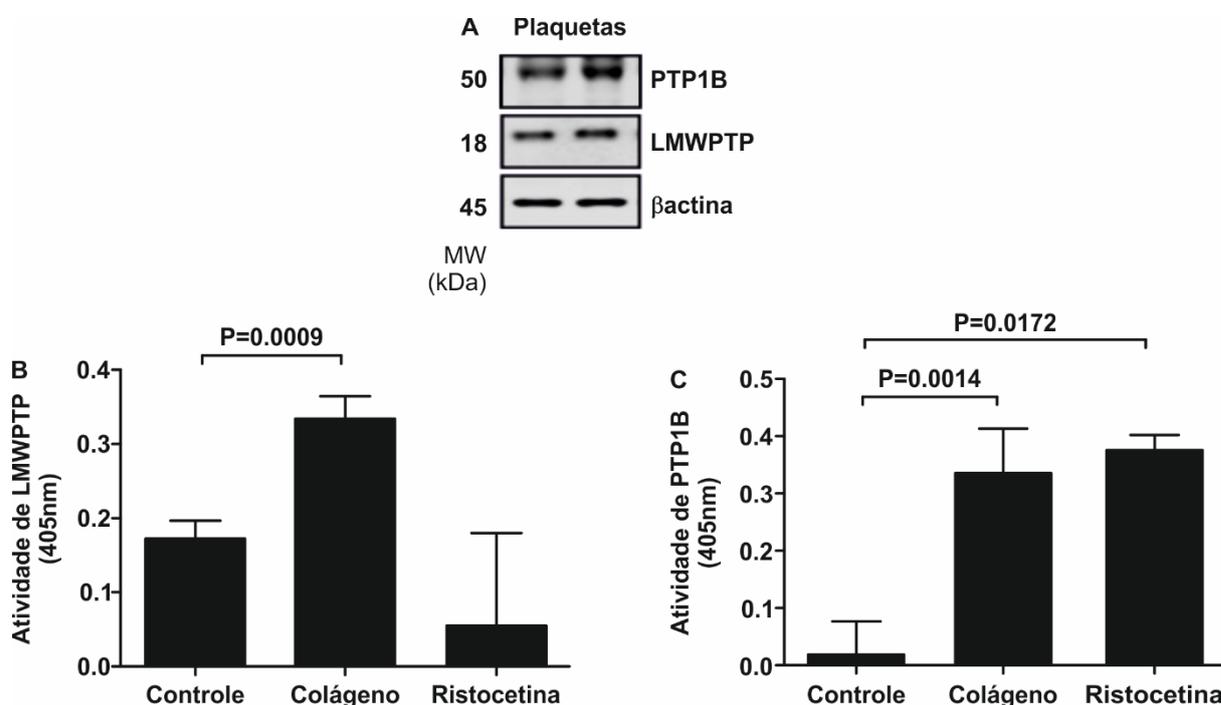


Figura 8. LMWPTP e PTP1B respondem diferentemente ao estímulo de plaquetas por colágeno e ristocetina. (A) Análise de *western blot* de plaquetas de dois doadores diferentes indica a expressão de LMWPTP e PTP1B nessas amostras. β -actina foi utilizada como controle interno. (B, C) Plaquetas foram estimuladas por colágeno (2 μ g/mL) ou ristocetina, em seguida as plaquetas foram lisadas e as fosfatases LMWPTP e PTP1B foram imunoprecipitadas, com subsequente dosagem da atividade de ambas as enzimas.

Desta forma, analisamos mediadores de vias de sinalização responsivas ao colágeno, em plaquetas. A fosforilação constitutiva de FAK, integrina β 3 e p38 (**Figura 9A-C**) e ausência de ativação de Erk (**Figura 9D**) foram notadas em plaquetas. No entanto, o efeito mais proeminente em ativação da via de sinalização, por estímulo de colágeno, é visto em Src quinase, determinada pela fosforilação em resíduo de Y416 (resíduo ativador) – **Figura 9E**.

Para confirmar a importância da família de Src quinase na função plaquetária, foi analisada a resposta de função plaquetária através do ensaio de agregação na presença do inibidor seletivo de Src (PP2). De forma concordante, apenas quando o agonista colágeno foi utilizado, é possível observar redução de agregação na presença de PP2 (**Figura 9F** e **Figura 26-I**), fato não observado na agregação induzida pela ristocetina (**Figura 9G** e **Figura 26-I**). Portanto, esses dados sugerem que a ativação da agregação por colágeno é particularmente dependente da via de sinalização mediada por Src.

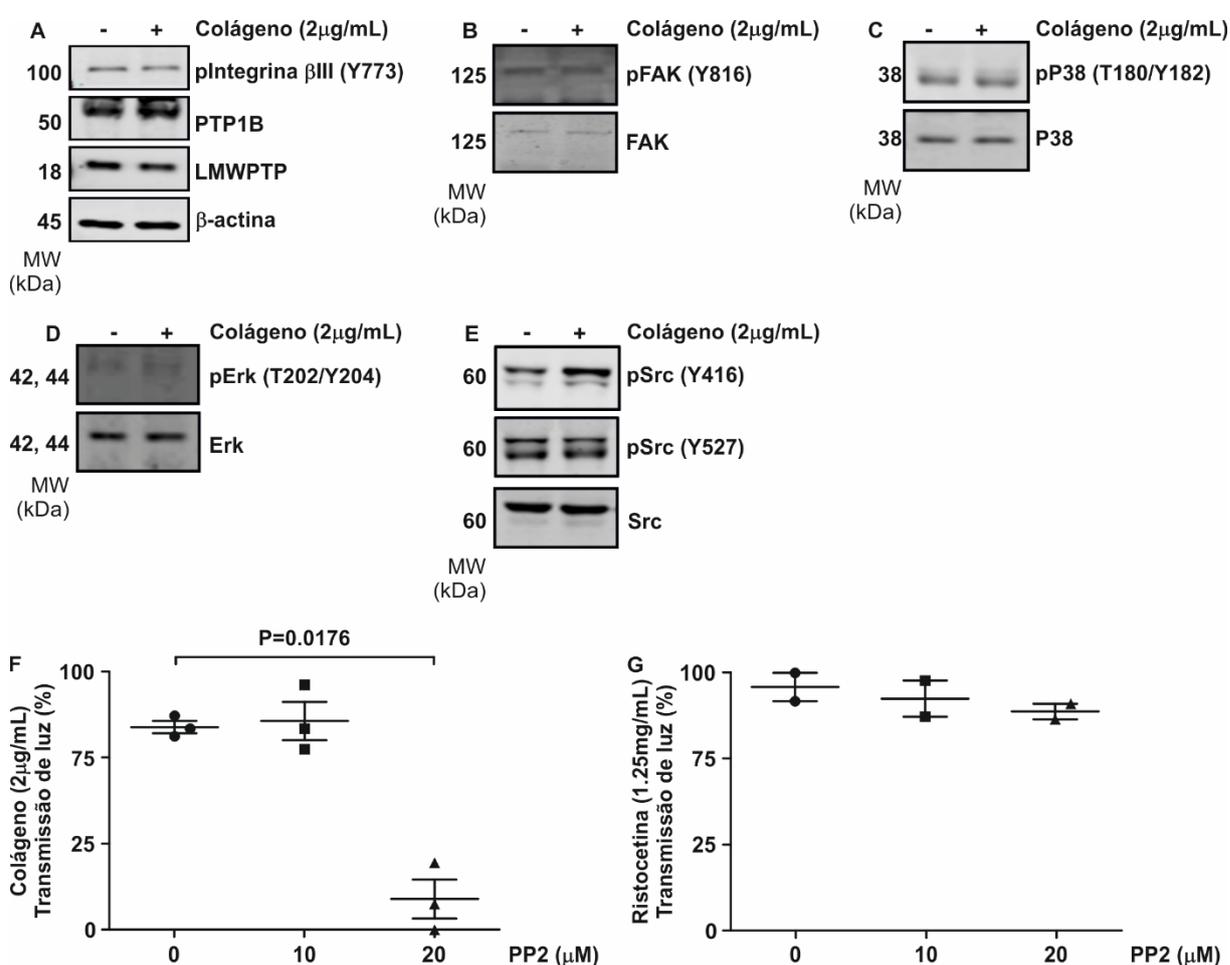


Figura 9. Expressão de tirosina fosfatase e atividade de quinases em plaquetas estimuladas por colágeno – diferente sensibilidade frente a inibidor de Src e agonistas colágeno e ristocetina. Plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 μ g/mL), seguida da análise de Integrina β III, PTP1B, LMWPTP (A); FAK (B); P38 (C); Erk (D) e Src (E) por *western blot*. β -actina e proteínas totais foram utilizadas como controle interno. (F-G) Plaquetas foram pré-incubadas com PP2 (inibidor de Src), por 5 minutos, seguido de estímulo com colágeno (2 μ g/mL) (F) ou ristocetina (1.25 mg/mL) (G). A agregação foi monitorada por 10 minutos após adição do agonista, no agregômetro da Chronolog.

4.1.3. 3-Bromopiruvato compromete a eficiência de resposta de plaquetas ao colágeno

Com base nos dados mostrados, em que a atividade da LMWPTP e PTP1B é aumentada em plaquetas ativadas em resposta ao colágeno, decidimos investigar se o 3BP seria capaz de afetar a LMWPTP derivada de plaquetas e da PTP1B (essa última foi incluída na análise como padrão de comparação com a LMWPTP e também por evidências que é importante no processo tumoral – Hoekstra et al, 2016). Portanto, a atividade das duas proteínas tirosina fosfatases (LMWPTP e PTP1B) e a expressão/fosforilação de quinases e integrina relevantes no processo de ativação plaquetária foram avaliadas. A atividade de LMWPTP (derivada das plaquetas estimuladas por colágeno) e PTP1B (recombinante) foi significativamente reduzida por 3BP (**Figura 10**). O ensaio foi realizado com proteína precipitada e recombinante, portanto, se avaliou a capacidade do 3BP atuar diretamente nessas enzimas.

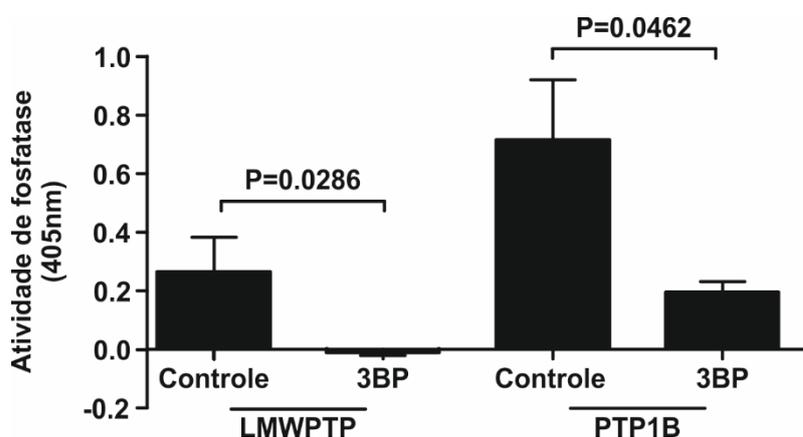


Figura 10. 3-Bromopiruvato tem capacidade de inibir fosfatases isoladas de plaquetas. Plaquetas foram estimuladas com colágeno (2µg/mL) e LMWPTP foi imunoprecipitada. Para a atividade de PTP1B, foi utilizada proteína recombinante humana. Seguindo o tratamento com 3BP, precipitados foram submetidos ao ensaio de atividade de fosfatase.

Além disso, o tratamento das plaquetas com 3BP, por 10 minutos, reduz drasticamente a atividade constitutiva da Src (diminuição da fosforilação dos resíduos Y527 e Y416), bem como do nível de fosforilação da FAK e integrina (**Figura 11**).

De forma interessante, esses efeitos no nível de fosforilação das proteínas Src, FAK e integrina foram mantidos quando as plaquetas foram pré-tratadas com o 3BP, seguida da estimulação com o colágeno (agente pró-agregante) - (**Figura 11C**

e D). Entretanto, p38 MAPK é ativada nessas condições, demonstrado pelo aumento de fosforilação dos resíduos T180 e Y182 (**Figura 11E**). A estimulação da p38, após o tratamento das plaquetas com o colágeno, pode ser um indicativo da ação anti-agregante desse composto. Recentemente, Hsia e colaboradores (2018) demonstraram que o flavonoide morina (também inibidor de LMWPTP) inibiu a agregação plaquetária, e manteve ativada a p38 (Hsia et al, 2018; Lyman et al, 2019). Em conjunto, esses dados sugerem que a estimulação de plaquetas por colágeno aumenta a atividade de fosfatases e de Src, ambas as quais estão reduzidas após o tratamento com 3BP.

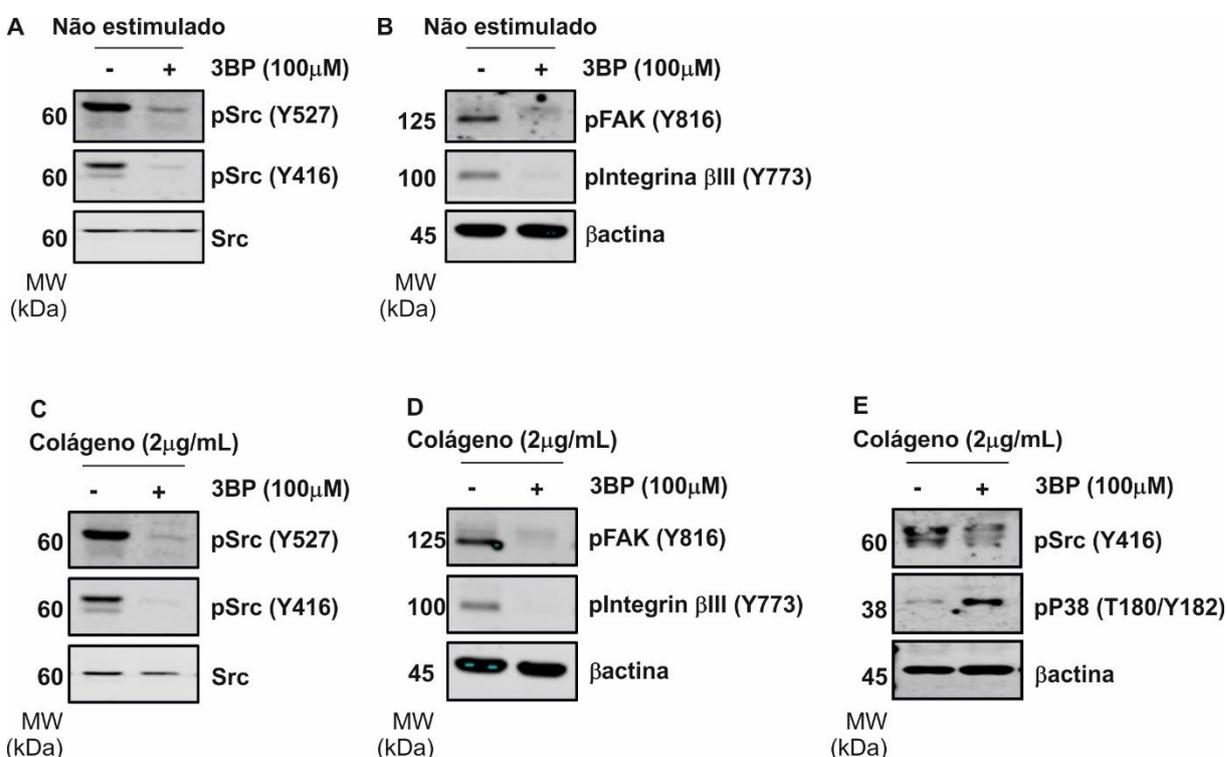


Figura 11. 3-Bromopiruvato inibe a sinalização intracelular em plaquetas. (A-B) Plaquetas foram pré-tratadas com 3BP por 10 minutos. A análise de *western blot* foi realizada para as proteínas indicadas na figura, e β -actina e Src total foram utilizadas como controle interno. (C-E) Plaquetas foram pré-tratadas com 3BP por 10 minutos e incubadas com colágeno (2 μ g/mL). A análise de *western blot* foi realizada para as proteínas indicadas na figura, e β -actina foi utilizado como controle interno.

4.1.4. 3-Bromopiruvato diminui o efeito pró-trombótico do colágeno

Os efeitos inibitórios do 3BP em quinases e fosfatases de plaquetas nos levaram a investigar se esses efeitos seriam em decorrência do comprometimento da viabilidade das plaquetas. Portanto, foi avaliada a capacidade das plaquetas reduzirem o MTT (indicativo da função mitocondrial) e marcadores de morte celular

(caspases e proteínas pró- e anti-apoptóticas).

Como mostrado na **Figura 12A**, o tratamento das plaquetas com o 3BP não comprometeu a integridade das caspases -8 e -3, ou seja, ambas não foram clivadas. Desta forma, apesar do 3BP inibir as quinases Src e FAK das plaquetas, indução de morte por apoptose não foi disparada por esse composto. A clivagem das caspases -8 e -3 é um marcador de morte celular por apoptose (Davison et al, 2004; Liu et al, 2017). Além disso, os níveis de expressão de proteínas pró-apoptótica Bax e anti-apoptótica Bcl-2 estão inalterados após o tratamento com 3BP em plaquetas (**Figura 12B**).

A via glicolítica tem sido descrita como um importante mediador da função plaquetária (Ravi et al, 2015; Nayak et al, 2018). Portanto, tendo em vista que o 3BP é capaz de inibir enzimas dessa via metabólica e enzimas mitocondriais (Azevedo-Silva et al, 2015), avaliamos se esse efeito também ocorre nas plaquetas. Para tal, foi avaliada a capacidade das plaquetas reduzirem o corante MTT a formazan (processo dependente, primordialmente, da função mitocondrial) – (Vistica et al, 1991). Como mostrado na **Figura 12C**, o tratamento das plaquetas com o 3BP causa uma diminuição da capacidade dessas células metabolizarem o MTT.

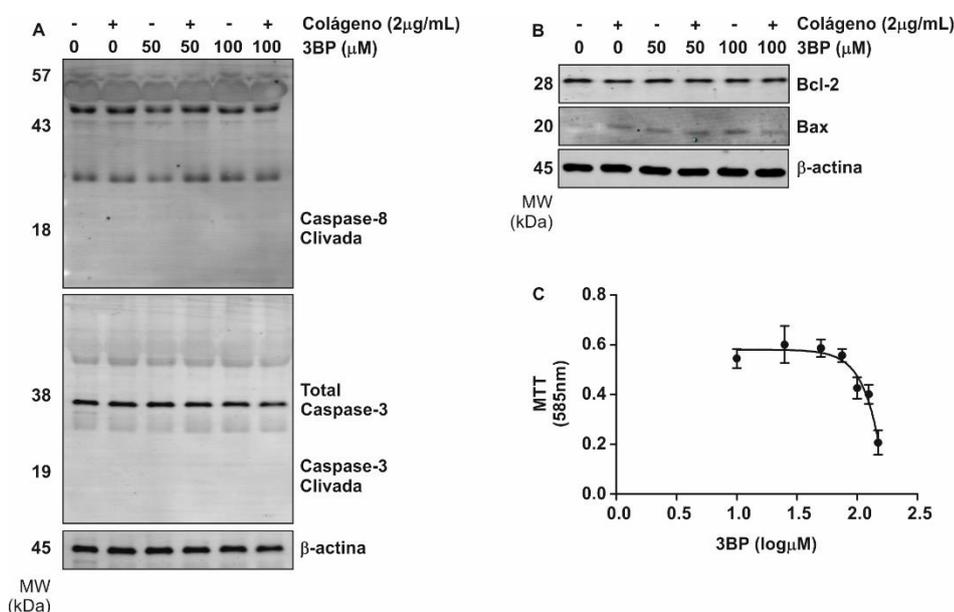


Figura 12. 3BP diminui atividade metabólica e função plaquetária. (A, B) Plaquetas foram submetidas a 50µM e 100µM de 3BP pelos tempos indicados, e a expressão de Bcl2 e BAX (A), bem como caspase clivada (B) foram determinadas por *western blot*. β-actina foi utilizada como controle interno. (C) Plaquetas isoladas foram submetidas a diferentes concentrações de 3BP, e a atividade metabólica foi medida pelo ensaio de MTT.

Devido à importância da Src quinase na agregação plaquetária mediada por colágeno, e ao efeito inibitório do 3BP na via de sinalização de Src, foi examinado se esse composto poderia interferir na ativação e agregação plaquetária em resposta a agonistas específicos. Conforme mostrado na **Figura 13A** e **Figura 26-II**, o 3BP (100 μM) foi capaz de inibir a agregação plaquetária dependente de colágeno. O colágeno atua através da interação com integrina $\alpha 1\beta 2$, integrina $\alpha \nu\beta 3$ e Glicoproteína GPVI na superfície plaquetária (Roberts et al, 2004; Farndale, 2006). Ativação de plaquetas por colágeno é acompanhada pelo aumento de expressão de integrina $\beta 3$, receptor de FvW e P-Selectina na superfície da plaqueta, e o tratamento com 3BP reduziu significativamente a expressão de integrina $\beta 3$ e do receptor de FvW nessas células, conforme determinado por análise de citometria de fluxo (**Figura 13B**).

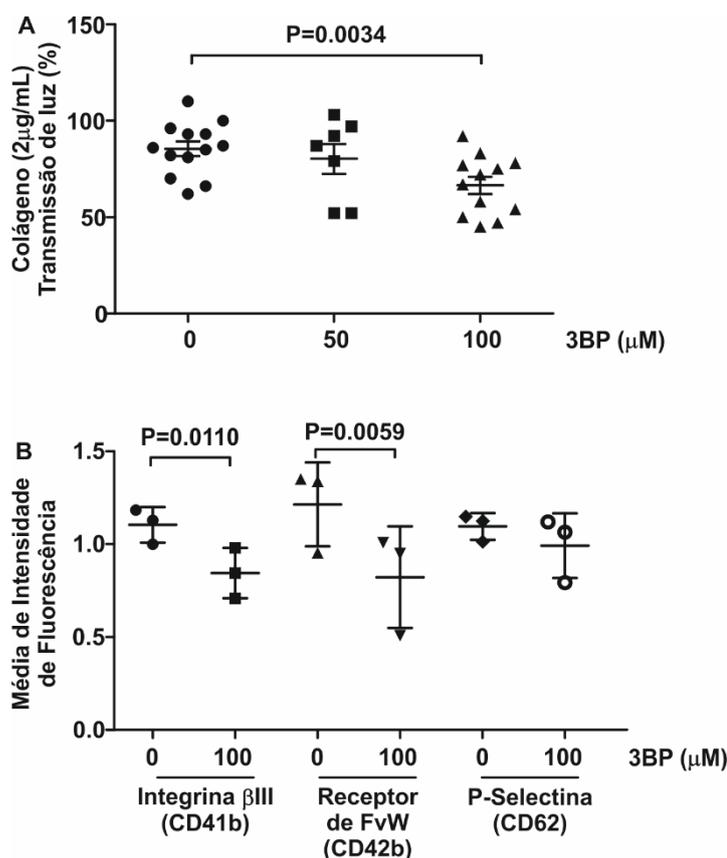


Figura 13. Influência do 3BP na agregação plaquetária estimulada por colágeno. (A) Plaquetas foram pré-incubadas com 3BP (5 minutos) e em seguida estimuladas com colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$). A agregação foi acompanhada por 10 minutos após adição do agonista, no agregômetro da Chronolog. (B) Expressão de marcadores de ativação plaquetária na presença de 3BP. Plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$), e a detecção de expressão de Integrina $\beta 3$, receptor de FvW e P-Selectina foi feita usando anticorpos CD41b-FITC, CD42b-PE e CD62-APC, respectivamente, por citometria de fluxo.

Além disso, é possível observar os efeitos de 3BP em função plaquetária por análise de expressão de marcadores de ativação plaquetária expressos na membrana, como Integrina β III, P-Selectina e receptor de fator de von Willebrand (FvW) por citometria de fluxo (**Figura 14**). No caso de plaquetas tratadas com 3BP e trombina, foi observado maior efeito em diminuição da expressão de P-Selectina, importante marcadora do processo de ativação plaquetária por sua expressão estar associada à fusão de grânulos a membrana plaquetária, através do recrutamento por diversos agonistas (Coupland e Parish, 2014).

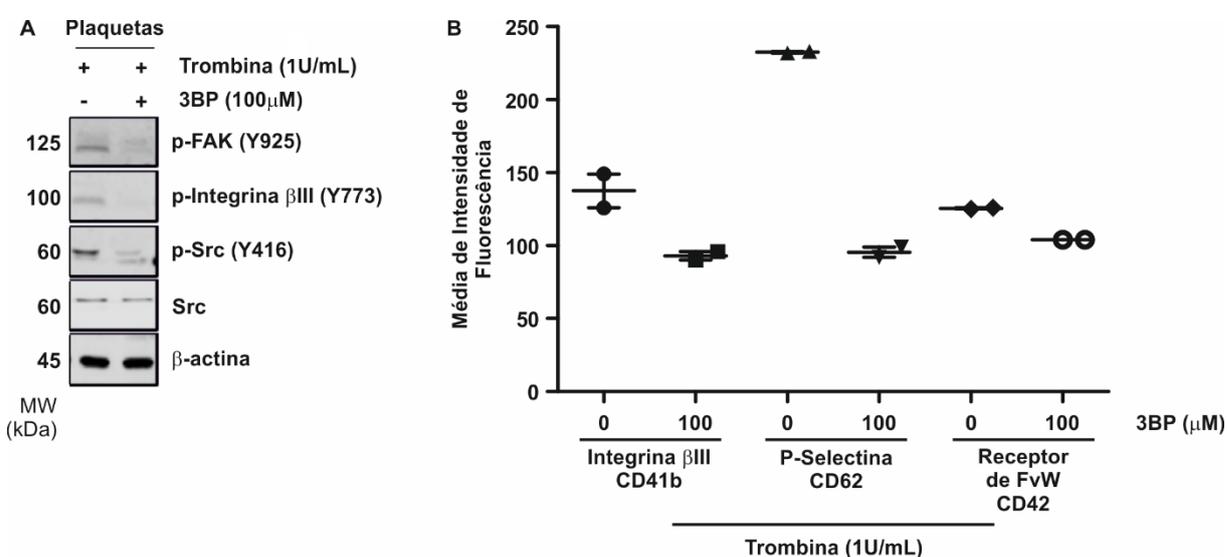


Figura 14. Influência do 3BP na ativação plaquetária estimulada por trombina. (A) A análise de *western blot* foi realizada para as proteínas indicadas na figura, e β -actina foi utilizado como controle interno. (B) Expressão de marcadores de ativação plaquetária na presença de 3BP. Plaquetas foram estimuladas com trombina (1U/mL), e a detecção de expressão de Integrina β 3, receptor de FvW e P-Selectina foi feita usando anticorpos CD41b-FITC, CD42b-PE e CD62-APC, respectivamente, por citometria de fluxo.

Por outro lado, a agregação plaquetária induzida por ristocetina, mediada pela interação com FvW em receptores GPIb (Kornblith et al, 2018), não foi reduzida pelo pré-tratamento de plaquetas com 3BP (**Figura 15A**, **Figura 26-II**), enquanto a expressão de integrina β 3, receptor de FvW e P-Selectina na presença de ristocetina não foi afetada (**Figura 15B**). Sendo assim, os dados apresentados aqui, revelam que o 3BP é capaz de reduzir a ativação plaquetária seletivamente (em resposta ao colágeno), e essa ação não é em decorrência de indução de apoptose (morte) das plaquetas.

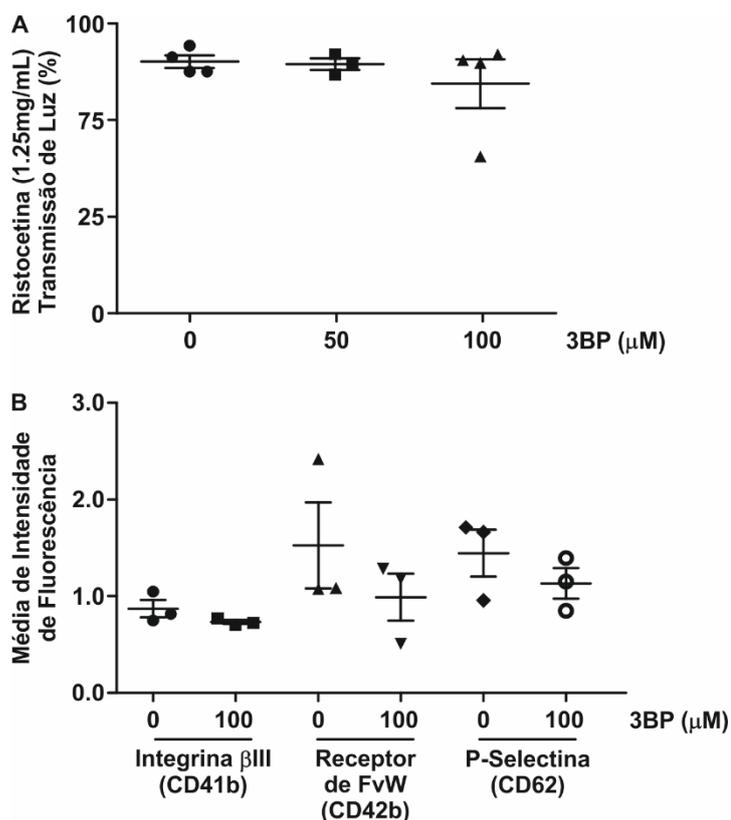


Figura 15. Influência do 3BP na agregação plaquetária estimulada por ristocetina. (A) Plaquetas foram pré-incubadas com 3BP (5 minutos) e em seguida estimuladas com ristocetina (1.25mg/mL). A agregação foi acompanhada por 10 minutos após adição do agonista, no agregômetro da Chronolog. (B) Expressão de marcadores de ativação plaquetária na presença de 3BP. Plaquetas foram estimuladas ristocetina (1.25mg/mL), e a detecção de expressão de Integrina β 3, receptor de FvW e P-Selectina foi feita usando anticorpos CD41b-FITC, CD42b-PE e CD62-APC, respectivamente, por citometria de fluxo.

4.1.5. Função plaquetária é dependente de fosfatases específicas

Uma vez que o 3BP não é um inibidor específico de fosfatases, para confirmar o envolvimento de fosfatases na ativação plaquetária, foi verificada a função plaquetária com uso de inibidor da PTP1B. Como esperado, CinnGEL inibiu especificamente PTP1B (**Figura 16A**, parte de cima), mas não a LMWPTP (**Figura 16A**, parte de baixo). Além disso, a inibição da PTP1B foi acompanhada pela redução de ativação de Src (**Figura 16B**). Em concordância, foi observado que a ativação plaquetária na presença de CinnGEL foi significativamente diminuída, com a inibição de PTP1B (**Figura 16C**). De forma interessante, a expressão de marcadores de ativação plaquetária induzida por colágeno: integrina β 3, receptor de FvW e P-Selectina foi significativamente reduzida, quando a PTP1B foi inibida (**Figura 14D**).

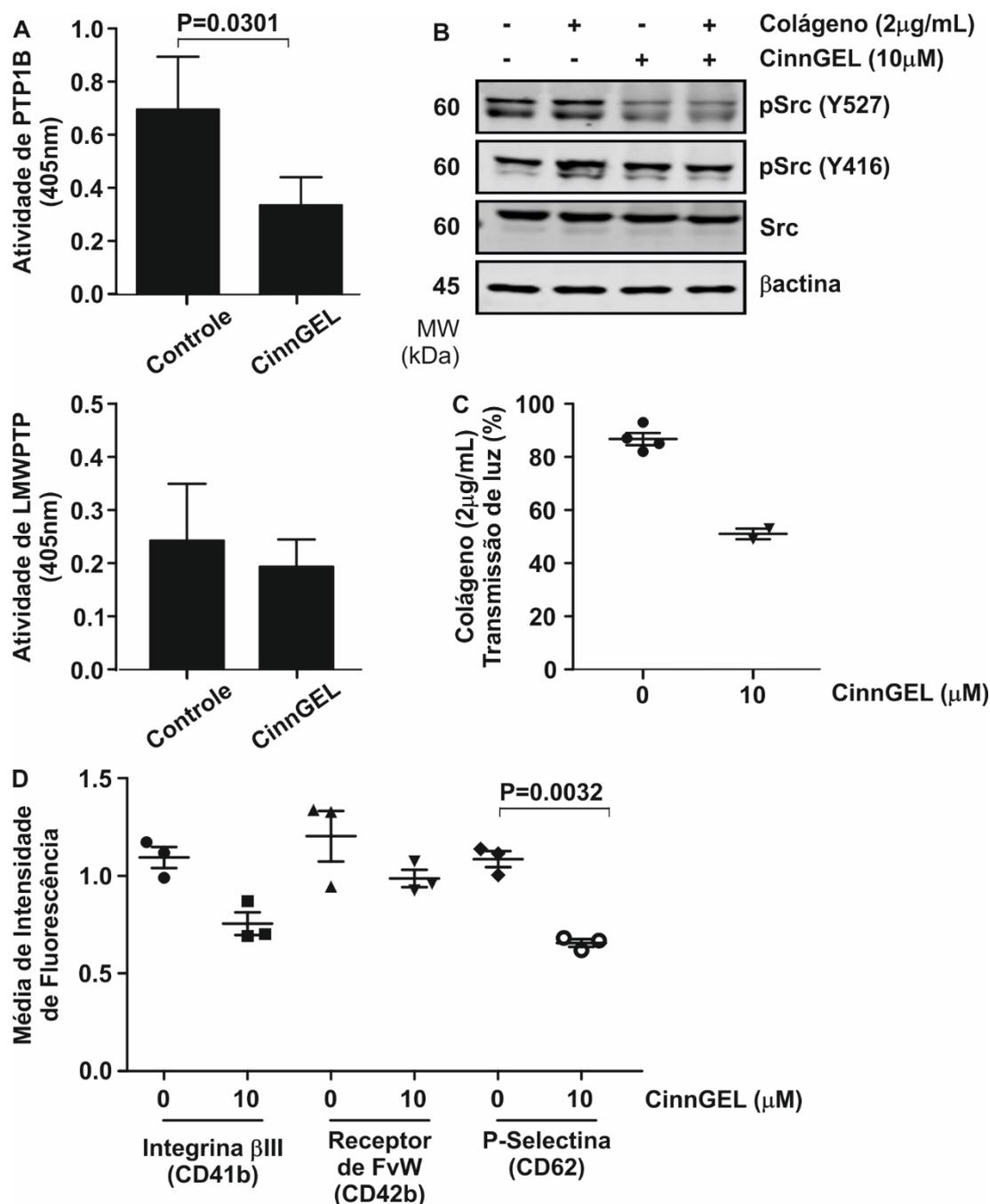


Figura 16. Função plaquetária é afetada negativamente por inibidor seletivo de PTP1B. (A) Ensaio de atividade de fosfatase para PTP1B foi realizado com proteína recombinante humana. Para dosagem de atividade de LMWPTP, plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 μ g/mL) e LMWPTP foi imunoprecipitada. Seguindo o tratamento com CinnGEL (inibidor de PTP1B), proteína recombinante e precipitados foram submetidos a ensaio de atividade de fosfatase. (B) Plaquetas foram pré-tratadas com CinnGEL ou deixadas sem tratamento, por 5 minutos. Em seguida, foram deixadas sem estímulo. Análise de *western blot* foi feita para proteínas indicadas, sendo β -actina utilizada como controle interno. (C) Ensaio de agregação foi realizado utilizando colágeno após pré-tratamento com inibidor específico de PTP1B (CinnGEL). (D) Expressão de receptor de FvW (CD41-FITC), Integrina β 3 (CD42-PE) e P-Selectina (CD62-APC) foi investigada em plaquetas estimuladas por colágeno, pré-tratadas com inibidor específico de PTP1B (CinnGEL).

É digno de nota que quando foi utilizado inibidor da tirosina fosfatase SHP, NSC87887, a função plaquetária não foi afetada, tanto pela análise de agregação, quanto pela análise dos marcadores de ativação (**Figura 17** e **Figura 26-III**). Esse resultado reforça a hipótese de seletividade de proteínas tirosina fosfatases na função plaquetária colágeno-dependente. De fato, SHP, especificamente a SHP-2, foi reportada como modulador negativo do processo de adesão, sendo a maior contribuição desta fosfatase em eventos agregantes e trombina-dependente (Edmead et al, 1999; Henshall et al, 2001), os quais não serão abordados nesse estudo.

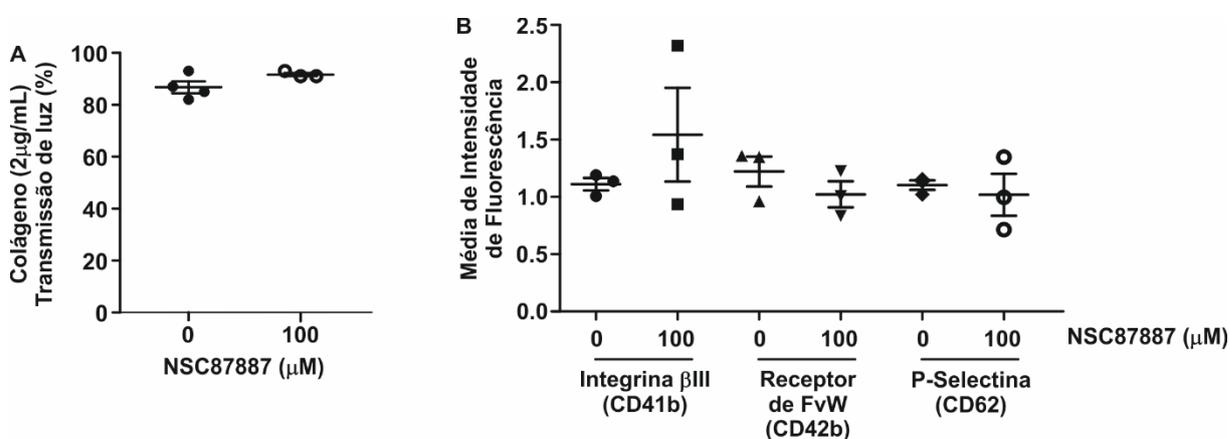


Figura 17. Função plaquetária não é inibida por inibidor seletivo de SHP1. (A) Ensaio de agregação plaquetária foi realizado com plaquetas estimuladas por colágeno, após pré-tratamento com específico inibidor de SHP (NSC87887). (B) Expressão de receptor de FvW (CD41-FITC), Integrina β3 (CD42-PE) e P-Selectina (CD62-APC) foi investigada em plaquetas estimuladas por colágeno pré-tratadas com inibidor específico de SHP (NSC87887).

4.1.6. Duplo efeito de 3-bromopiruvato na pré-metástase: atuação na interação plaquetas-células de câncer colorretal

Com base nos mecanismos moleculares disparados em resposta ao tratamento das plaquetas com 3BP, decidimos avaliar a resposta das células câncer colorretal a esse composto, pelo método de redução do MTT. As quatro linhagens analisadas tiveram comprometimento da viabilidade com valores de IC_{50} na faixa de 40 a 80 µM (**Tabela 5** e **Figura 18A-B**). O valor de IC_{50} obtido nesse projeto é coerente com dados publicados pela literatura (Sun et al, 2015; Chen et al, 2017). Esses valores encontram-se na média entre os valores de IC_{50} reportados em outros tipos de câncer pela literatura, como em Câncer de Próstata e Hepatocelular Carcinoma (Pichla et al, 2019; Sun et al, 2020).

Outro ponto investigado foi à capacidade do 3BP diminuir a atividade da LMWPTP. De fato, esse composto foi capaz de inibir a atividade dessa fosfatase (Figura 18C).

Tabela 5. IC₅₀ para células CRC.

Linhagem celular	IC ₅₀ (μM)	Intervalo (μM)
HCT116	41.81	35.44 – 49.33
Caco-2	81.34	56.68 – 116.70
T84	47.28	37.67 – 59.33
HT29	72.79	69.40 – 76.35

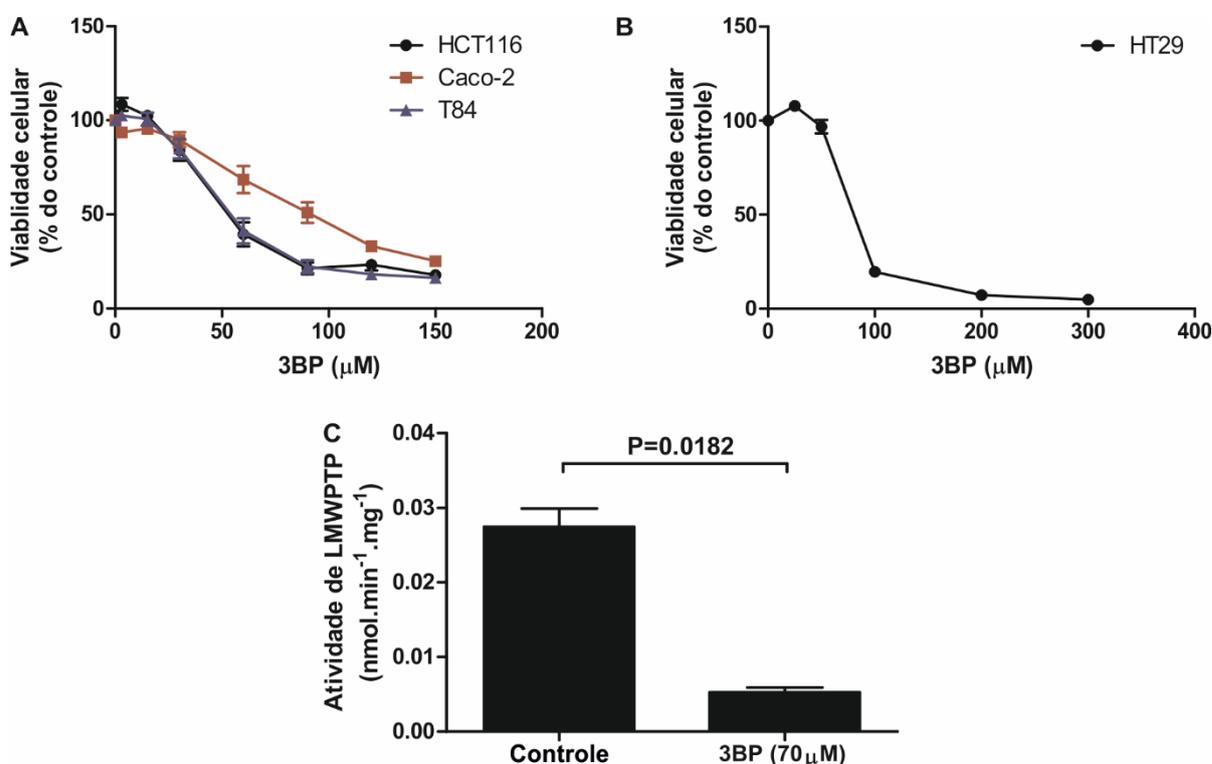


Figura 18. Efeitos de 3-bromopiruvato em células de câncer colorretal. (A-B) Gráfico de viabilidade celular para as células HCT116, Caco-2, T84 (A), HT29 (B). As células HCT116, Caco-2, T84, HT29 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas e cultivadas por 24 horas, em seguida o meio de cultura foi removido e foi adicionado meio de cultura contendo tratamento com 3BP. Após 24 horas, o meio de tratamento foi removido e MTT 0.5 mg/mL foi adicionado em meio de cultura sem SFB. Após 3 horas de incubação a 37°C, o meio de cultura com MTT foi retirado e o formazan solubilizado com etanol e a absorbância do mesmo medido a 570 nm. (C) Ensaio de atividade de LMWPTP por pNPP. Células HT29 foram plaqueadas por 24 horas. Após incubação, foram tratadas com concentração de 0 e 70 μM por 24 horas. A lise de células foi feita conforme descrito em protocolo e a análise de atividade foi feita utilizando-se pNPP. As imagens são representativas dos experimentos realizados.

4.1.7. 3-Bromopiruvato diminui a capacidade de células de câncer de colorretal em ativar plaquetas

Uma vez que o risco de desenvolvimento de tromboembolismo em pacientes com câncer é mediado em parte, pela ativação plaquetária por células tumorais (Mitrugno et al, 2016), e também a capacidade de sobreviver na corrente sanguínea, durante a disseminação hematogênica, é dependente da interação entre células tumorais e plaquetas, decidimos investigar o comportamento de plaquetas, após co-cultivá-las na presença de células de CRC (HCT116, HT29 e Caco-2). Primeiramente, foi feita a análise da capacidade de interação de células CRC e plaquetas a partir da adição de células CRC, ressuspendidas em NaCl (0.9%), em PRP. Foi feita a investigação de capacidade de interação célula tumoral-plaqueta considerando as condições de exposição de plaquetas, às células tumorais, previamente ou não tratadas com 3BP. Conforme mostrado na **Figura 19**, células de CRC tem a capacidade de aumentar a agregação plaquetária frente ao estímulo com colágeno. Além disso, o tratamento com 3BP reduziu significativamente a agregação plaquetária, determinada por transmitância óptica (agregômetro) e também foi observado menor formação de trombo na co-cultura na presença do 3BP, conforme observado ao microscópio (**Figura 19C-D**).

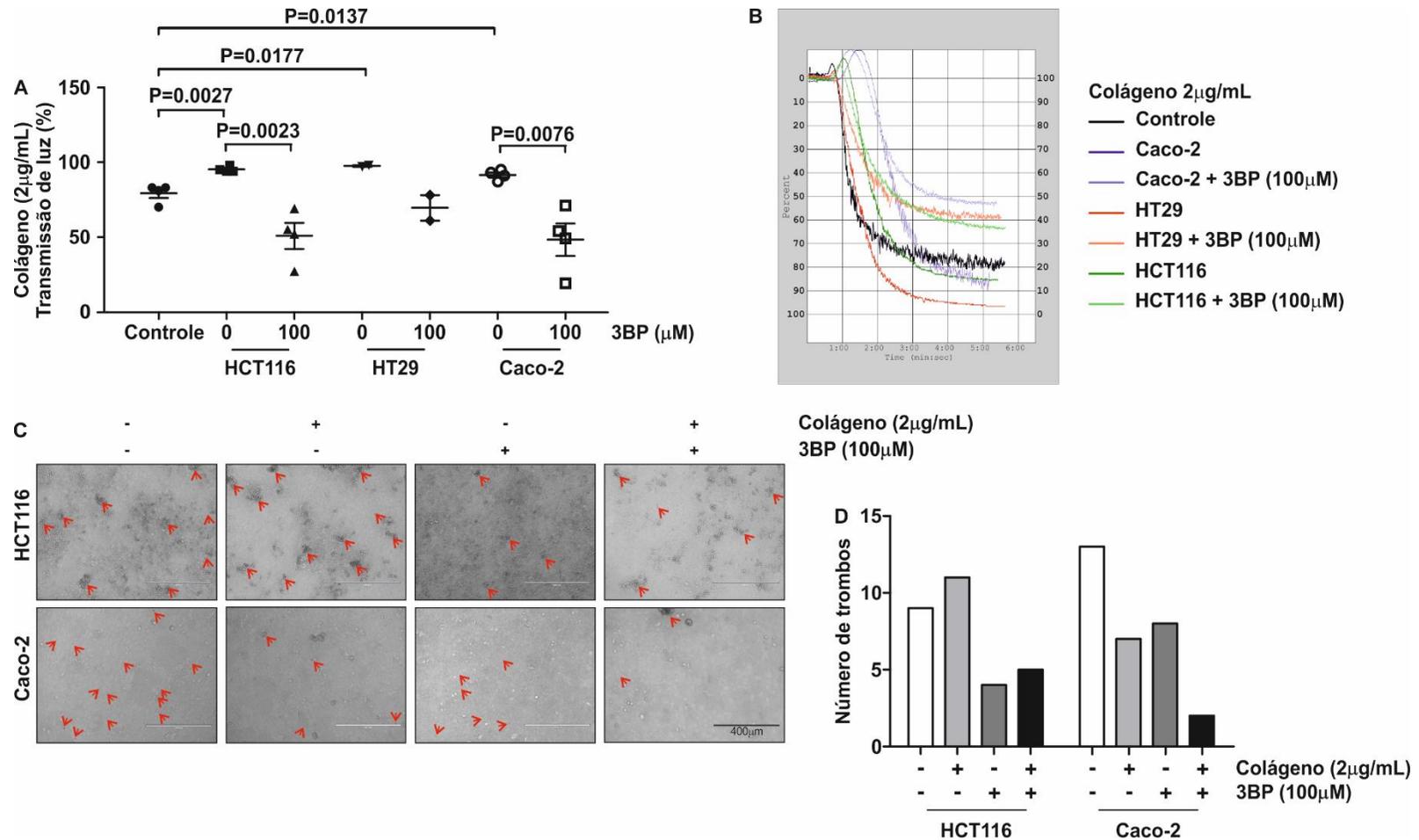


Figura 19. Agregação induzida por células tumorais, formação de trombo e ativação plaquetária reduzida por 3BP. (A-B) Células CRC (1.5×10^4 células) e 3BP (100µM) foram incubadas na etapa de pré-teste por 5 minutos, em seguida, plaquetas foram estimuladas pelo agonista colágeno (2µg/mL) e agregação foi monitorada por 10 minutos. (C) Co-cultura de células tumorais e plaquetas visualizadas em microscópio. Magnificação de 10X (barra de escala 400µm). A formação de trombo foi avaliada, quantificadas e indicadas por setas. (D) Gráficos representativos de agregação plaquetária. Tratamento de plaquetas com colágeno na ausência ou presença de células tumorais (Caco-2 e HCT116) e 3BP. As imagens são representativas dos experimentos realizados.

De fato, um aumento da expressão de LMWPTP e PTP1B é observado em plaquetas após co-cultura com HCT116 e Caco-2, com concomitante ativação de Integrina β 3 e Src (**Figura 20**). Esse efeito foi mediado por contato direto célula-célula, uma vez que o meio condicionado das respectivas células não apresentou mesmo efeito.

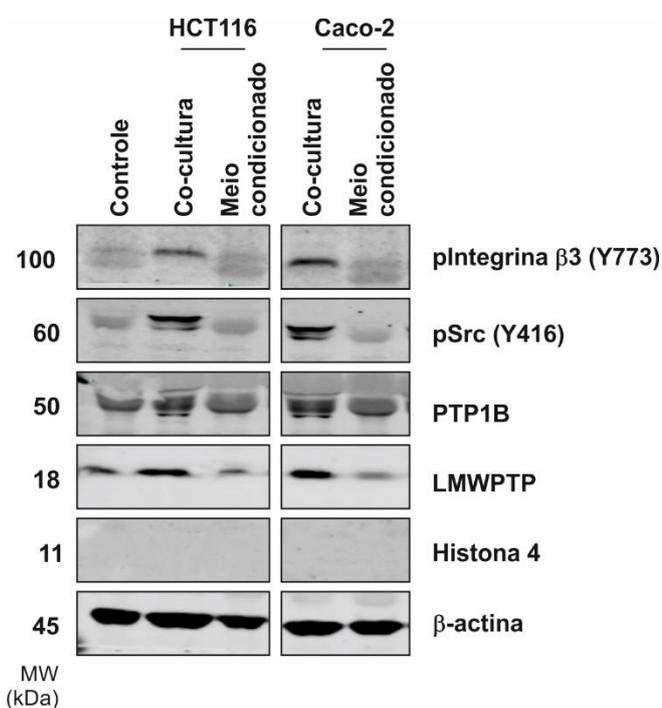


Figura 20. Expressão de proteínas marcadoras de ativação plaquetária em plaquetas mantidas em co-cultura com células CRC. Plaquetas provenientes de co-cultura de células CRC (HCT116 e Caco-2) foram lisadas e proteínas marcadoras de ativação plaquetária foram analisadas por western. β -actina foi utilizada como controle interno, e Histona 4 foi utilizada como controle de contaminação cruzada da co-cultura, uma vez que plaquetas não apresentam núcleo, e a expressão positiva de Histona 4 poderia ser um indicativo da contaminação da amostra por células CRC. As imagens são representativas dos experimentos realizados.

Como validação dos resultados, ainda foi verificada a expressão de marcadores de ativação plaquetária (FvW, integrina β 3 e P-Selectina) por citometria de fluxo (**Figura 21**). Na presença de células tumorais, os níveis dos marcadores foram significativamente reduzidos frente o tratamento com 3BP. Em análise conjunta, esses dados mostram que a atividade plaquetária pode ser diretamente modulada pelo contato direto com células tumorais, e sugere um potente efeito do 3BP em perturbar a interação célula tumoral-plaqueta. Portanto, demonstramos de forma inédita que o 3BP tem potencial para uso como agente preventivo do tromboembolismo e de metástase em pacientes oncológicos.

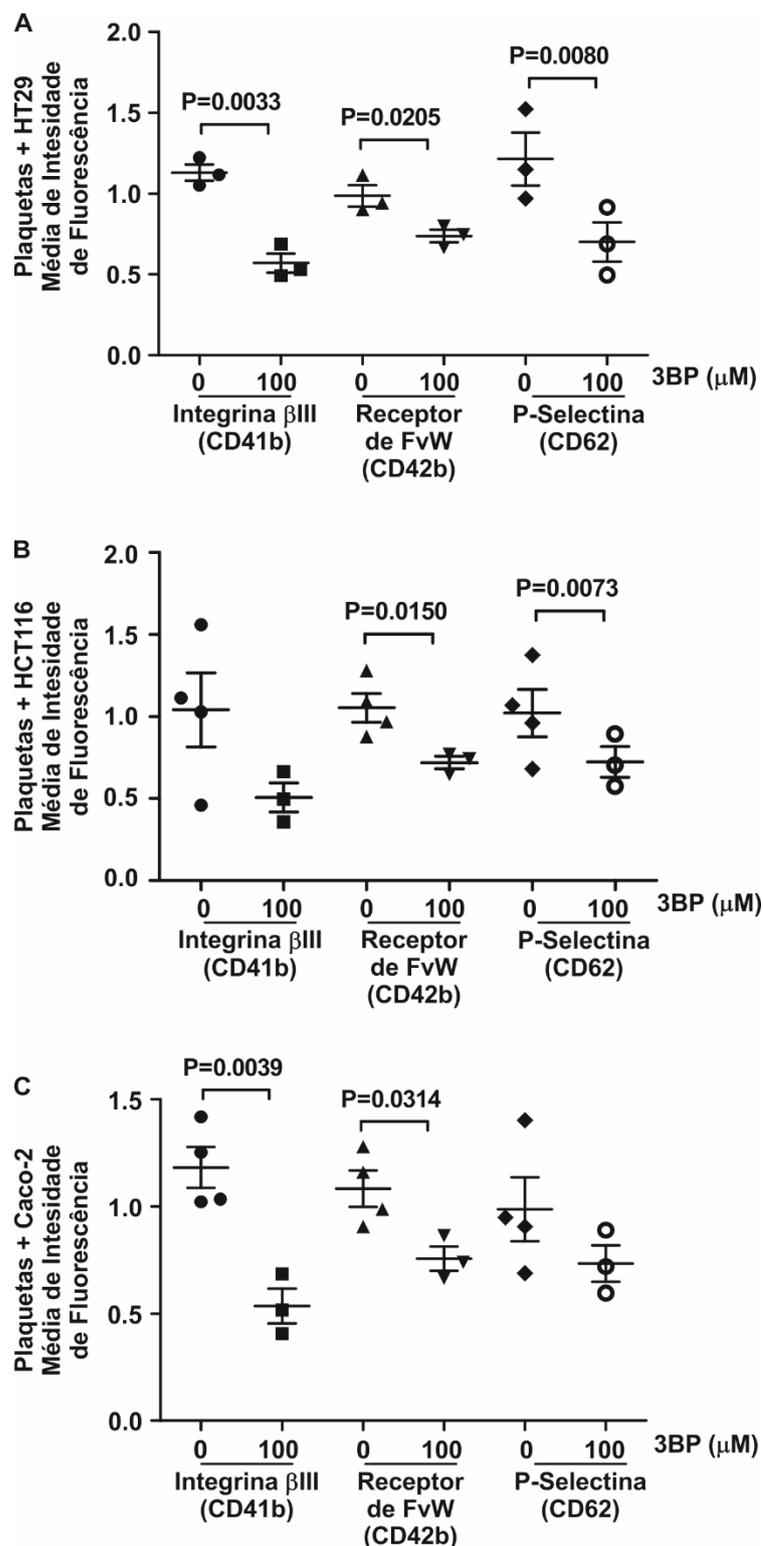


Figura 21. Expressão de proteínas de membrana em plaquetas ativadas por células CRC em co-cultura. (A-B) Plaquetas provenientes de co-cultura com células HT29 (A), HCT116 (B) ou Caco-2 (C) na ausência e presença de 3BP, e em seguida foram analisadas por citometria de fluxo com marcação para determinar expressão de receptor de FvW (CD41-FITC), Integrina β3 (CD42-PE) e P-Selectina (CD62-APC).

4.1.8. Hiper-reatividade de plaquetas provenientes de pacientes com câncer gastrointestinal foi reduzida pelo tratamento com 3-Bromopiruvato

Para avaliar a hipótese de que 3BP possa diminuir o risco de ativação plaquetária em pacientes com câncer, focamos no estudo da capacidade desse composto em diminuir a reatividade das plaquetas derivadas de pacientes com câncer gastrointestinal. Como esperado, plaquetas de pacientes com câncer gastrointestinal apresentaram maior sensibilidade à agregação induzida por colágeno, em comparação aos controles (indivíduos saudáveis) (**Figura 22A, Figura 26-V**), uma vez que a comparação foi feita com uma dosagem abaixo do padrão de diagnóstico de 2µg/mL (Ministério da Saúde, 2012). Entretanto, no ensaio de agregação com ristocetina, não foi observado diferença entre os pacientes e controles, o qual é um indicativo da especificidade molecular na disfunção de processos de adesão, por consequência da presença de proteínas tirosina fosfatases, nesses pacientes. Além disso, foi detectado maior expressão de P-Selectina (marcador de ativação plaquetária) em plaquetas de pacientes com câncer (**Figura 22B**). Ainda foi observado que o nível de expressão da LMWPTP, mas não de PTP1B, é maior em plaquetas de todos os pacientes estudados, comparados com os controles equivalentes, o qual é consistente com a maior ativação de Src (**Figura 22C**). Outro importante achado interessante é que 3BP reduziu significativamente a função plaquetária estimulada por colágeno (**Figura 23, Figura 26-VI**). Sendo assim, esses dados validam a hipótese de que fosfatases são reguladores chaves da função plaquetária (em condições normais, mas que em pacientes oncológicos, o maior nível da LMWPTP pode ser um indicativo de mal prognóstico); e sugerem que o 3BP tem potencial como agente para prevenir a agregação plaquetária em pacientes com câncer gastrointestinal.

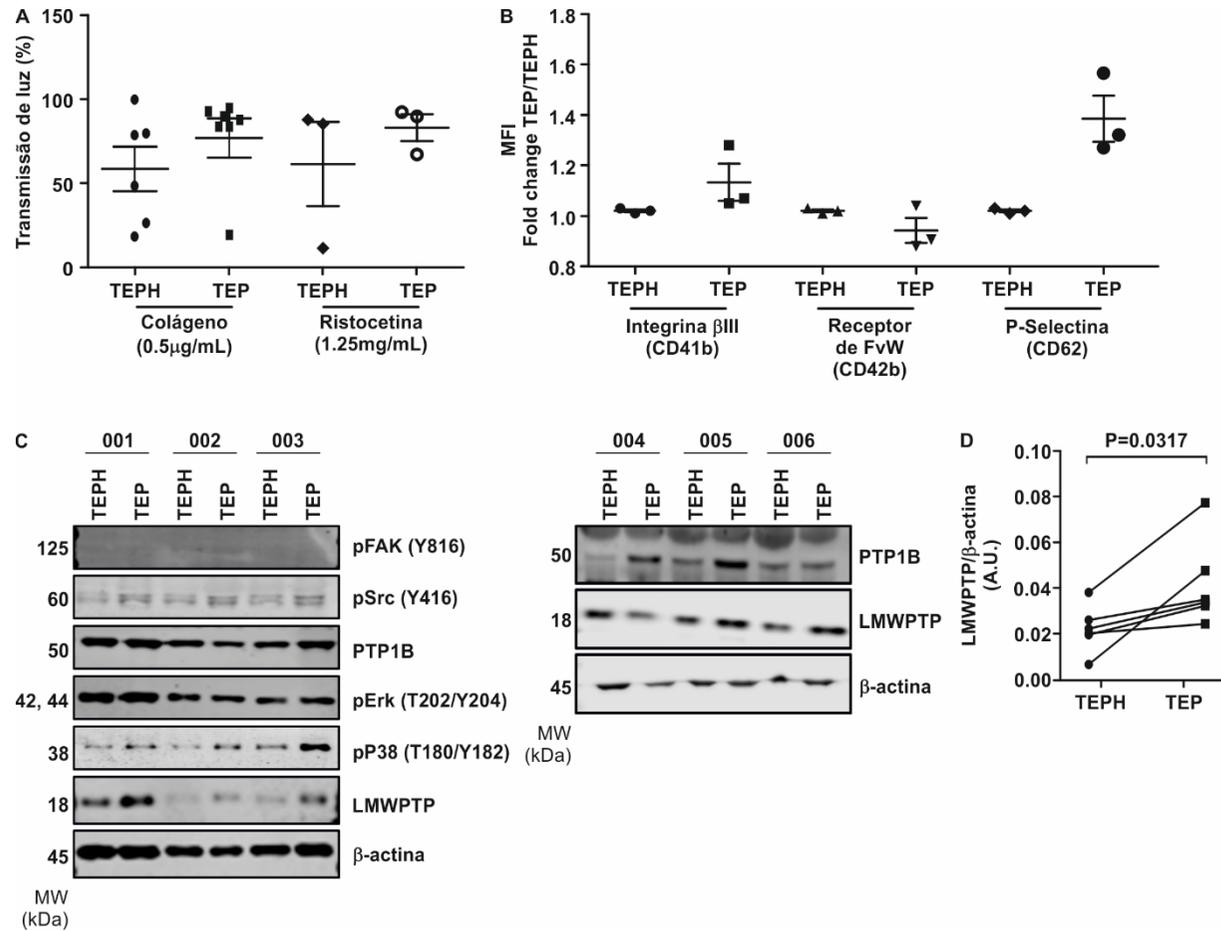


Figura 22. Plaquetas de pacientes com câncer de esôfago e CRC apresentam hiperagregabilidade que pode ser inibida por 3-Bromopiruvato. (A) Plaquetas de pacientes com câncer gastrointestinal (TEP) e indivíduos sadios (TEPH) foram estimuladas com colágeno (0.5µg/mL) ou ristocetina (1.25mg/mL), e agregação foi monitorada por 10 minutos. (B) Expressão de receptor de FvW (CD41-FITC), Integrina β3 (CD42-PE) e P-Selectina (CD62-APC) foi investigada em plaquetas de pacientes com câncer gastrointestinal (TEP) e indivíduos sábios (TEPH). (C-D) Plaquetas de pacientes com câncer gastrointestinal e indivíduos sadios foram lisadas e submetidas à análise por *western blot* das proteínas indicadas com análise estatística da expressão de LMWPTP em (D). β-actina utilizada como controle interno. Os números a esquerda do *blot* são os pesos moleculares referentes a cada proteína.

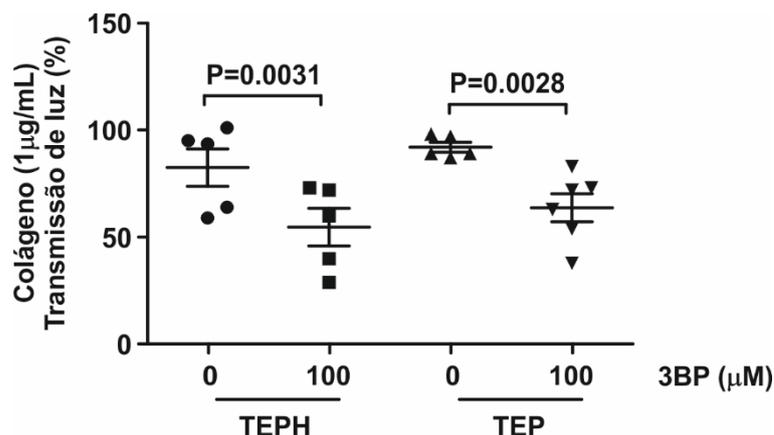


Figura 23. Inibição de agregação plaquetária com 3-Bromopiruvato em plaquetas de pacientes com câncer gastrointestinal. Ensaio de agregação plaquetária utilizando 3BP (100µM) como inibidor de função plaquetária. 3BP foi pré incubado com as plaquetas por 5 minutos, e em seguida, as plaquetas foram estimuladas utilizando colágeno (1µg/mL).

4.1.9. Contribuição do estudo no contexto da literatura

Pacientes com câncer, em particular que estão acometidos com tumor gastrointestinal, apresentam maior risco de desenvolver VTE. Apesar da causa do aumento do risco de VTE não ser completamente elucidado, relatos na literatura descrevem que células tumorais são capazes de aumentar a agregação plaquetária, em um processo conhecido como agregação plaquetária induzida por células tumorais (TCIPA) – (Van Zijl et al, 2011; Brunelle et al, 2009) para favorecer o processo de metástase, ao garantir a sobrevivência das células tumorais a partir da interação com elementos do sangue (plaquetas) na disseminação hematogênica.

Nesse presente estudo, foi observado diferenças em atividade de fosfatases, frente ao estímulo de plaquetas com diferentes agonistas. Ao contrário do que é visto com colágeno, ristocetina não é capaz de induzir a atividade de LMWPTP, sugerindo que a ativação plaquetária induzida por colágeno depende mais da atividade de LMWPTP. De forma consistente, em pacientes com câncer testados nesse estudo, a expressão de LMWPTP e agregação induzida por colágeno foram aumentadas comparadas como controles, indivíduos saudáveis.

Além disso, aumento de RNA mensageiro de LMWPTP foi identificado em plaquetas de pacientes com CRC, câncer de pâncreas, mama e hepatobiliar (Best et al, 2018) o que foi comprovado pelo presente estudo através da análise de expressão de LMWPTP, e que sugere que essa fosfatase possivelmente esteja relacionada ao risco elevado de VTE. Diversas evidências apontam a importante função de PTPs na biologia de plaquetas (Estevez et al, 2017; Lavergne et al, 2017).

Recentemente, foi mostrado que plaquetas contêm DUSP3 (do inglês, *dual specificity phosphatase 3*), e que a inibição dessas fosfatases reduz trombose arterial em ratos (Musumeci et al, 2015; Tautz et al, 2015). A funcionalidade de PTP1B já foi descrita em plaquetas anteriormente (Kuchay et al, 2007; Senis, 2013). Sendo assim, mostramos que a atividade de LMWPTP, em plaquetas, é modulada por colágeno, mas não por ristocetina, e identifica essa fosfatase como alvo terapêutico para hiperagregabilidade plaquetária. É importante ressaltar que 3BP diminuiu a reatividade de plaquetas de indivíduos saudáveis, bem como provenientes de pacientes com câncer gastrointestinal, pelo menos em parte, por inibir LMWPTP, PTP1B e Src. Foi demonstrado anteriormente que tanto PTP1B (Hoekstra et al, 2015) quanto LMWPTP (Zambuzzi et al, 2008; Ferreira et al, 2012) suportam a atividade de Src em células tumorais, o que reforça a capacidade dessas fosfatases atuarem positivamente na sinalização oncogênica de Src, a partir da defosforilação dos resíduos inibitórios dessa quinase. Entretanto, o fato que a agregação induzida por ristocetina e expressão de marcadores de ativação não foram inibidos pelo tratamento com 3BP sugere que este composto não foi capaz de inibir *in vivo* PTP1B, e que a inibição *in vitro* de LMWPTP é mais efetiva que PTP1B.

O uso de antitrombóticos como tratamento coadjuvante de câncer foi sugerido em 1982, com enfoque particular da capacidade de reduzir metástase (Zacharski, 1982). Além disso, também é descrito que o uso de terapia antitrombótica aumenta a sobrevivência de pacientes com CRC (Takahashi et al, 2017). Anteriormente, foi mostrado que LMWPTP e PTP1B contribuem para o potencial metastático de CRC (Hoekstra et al, 2015; Hoekstra et al, 2016). E, o tratamento com inibidores dessas fosfatases potencialmente afeta (compromete) dois mecanismos fisiopatológicos de uma única vez: metástase e trombose. Sendo assim, esse presente estudo mostra que fosfatases também participam de importante função na biologia de plaquetas e que contribuem para o risco aumentado de VTE em pacientes com câncer. Portanto, essas fosfatases podem ser alvo terapêutico, com uso de 3BP ou derivados, e que podem contribuir para reduzir o risco de VTE e metástase em pacientes com câncer gastrointestinal.

Nesse estudo, foi limitada a investigação de função plaquetária utilizando-se colágeno e ristocetina, uma vez que estudos *in vitro* mostraram que pacientes com câncer apresentaram aumento na agregação plaquetária colágeno-dependente (Cooke et al, 2013), e isso correlaciona com o score de risco de VTE (Basu et al,

2015). Além disso, plaquetas são facilmente ativadas em experimentos *in vivo*, e diversos protocolos de isolamento e lavagem reduzem essa ativação (Cazenave et al, 2004; Jankowski et al, 2004; Canault et al, 2010). O protocolo usado nesse estudo foi o mais compatível com a análise de plaquetas e ensaio de atividade de fosfatases. Não foi observada ativação não desejada de plaquetas em nossos estudos, já que diferentes protocolos de lavagem poderiam interferir nos resultados.

3BP foi descrito como ativador de diversas vias de morte celular (apoptose e autofagia) em CRC (Sun et al, 2015). Ademais, foi reportado que frente à combinação de 3BP com 5-Fluoracil (a primeira escolha de fármaco para o tratamento de CRC), 3BP aumentou a eficiência de 5-FU em promover morte celular em linhagens CRC (Chong et al, 2017). Entretanto, conforme reportado anteriormente, pacientes com CRC e inclusive com eventos metastáticos para fígado, principal órgão de acometimento de metástase nesse tipo de câncer, apresentavam maior expressão de LMWPTP comparado com tecido normal (Hoekstra et al, 2015). Além disso, a inibição de LMWPTP em células de leucemia mieloide crônica resistente a quimioterápicos aumentou a sensibilidade de morte dessas células (Ferreira et al, 2012). Células de CRC apresentaram sensibilidade ao tratamento com 3BP diferentemente. HCT116 e T84 apresentaram IC_{50} menor que Caco-2 e HT29. Esse fato poderia ser explicado, em parte, pela quantidade de LMWPTP que essas linhagens apresentam quando comparadas entre si. HT29 apresenta 33% maior expressão de LMWPTP que HCT116, bem como Caco-2 apresenta 70,5% e 64,7% maior expressão de LMWPTP que HCT116 e T84 respectivamente (densitometria em unidades arbitrárias) – (Figura 24).

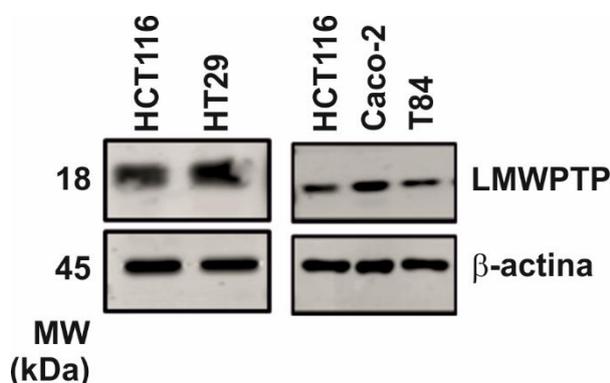


Figura 24. Expressão de LMWPTP em linhagens de CRC. Lisados de células HCT116, HT29, Caco-2 e T84 foram submetidas a western blot com anticorpo específico para LMWPTP. β -actina foi utilizada como controle interno. As imagens são representativas dos experimentos realizados.

Foi feita a investigação dos mecanismos moleculares associados com a hiperagregabilidade plaquetária como causa de VTE. Nesse presente estudo, foi confirmada a importância de atividade de Src para função plaquetária dependente de colágeno, e demonstrado como atividade de Src e integrina $\beta 3$ está aumentada após co-cultura de plaquetas com células tumorais. Além disso, é mostrado nesse trabalho que fosfatases modulam atividade de Src, isto é, LMWPTP e PTP1B estão presentes com plaquetas ativadas e o nível dessas fosfatases está aumentado após co-cultura com células CRC. Enquanto é surpreendente que a inibição de fosfatases reduz ativação plaquetária, o qual depende tão fortemente da atividade de Src, ambas as fosfatases LMWPTP e PTP1B foram mostradas anteriormente como essenciais para ativação de Src, o qual depende do balanço entre os sítos fosforilados (Kuchay et al, 2007; Ferreira et al, 2012).

Em conjunto, os dados apresentados validam nossa hipótese inicial de que a LMWPTP seria relevante para a disseminação das células tumorais ainda no tumor primário (extravasão), mas também para a disseminação hematogênica dessas células, tendo como aliadas, plaquetas. De fato, nas amostras de plaquetas de pacientes com câncer analisado, observamos que a expressão da LMWPTP e agregação disparada por colágeno foram aumentadas em relação aos controles (indivíduos saudáveis). Além disso, os dados apresentados somam novas informações à literatura sobre a possibilidade de essa fosfatase contribuir para o risco elevado de VTE em pacientes oncológicos. É importante ressaltar que o 3BP diminuiu a reatividade de plaquetas de indivíduos saudáveis, bem como provenientes de pacientes com câncer gastrointestinal, em parte, por inibir a LMWPTP. Apesar do grande avanço no desenvolvimento de protocolos terapêuticos de câncer, a efetividade da terapia em diversos tumores ainda é um desafio, especialmente em casos de metástase. Portanto, nossos resultados apontam o grande potencial de inibidores da LMWPTP para o controle da metástase, bem como para prevenir o processo de tromboembolismo (Figura 25).

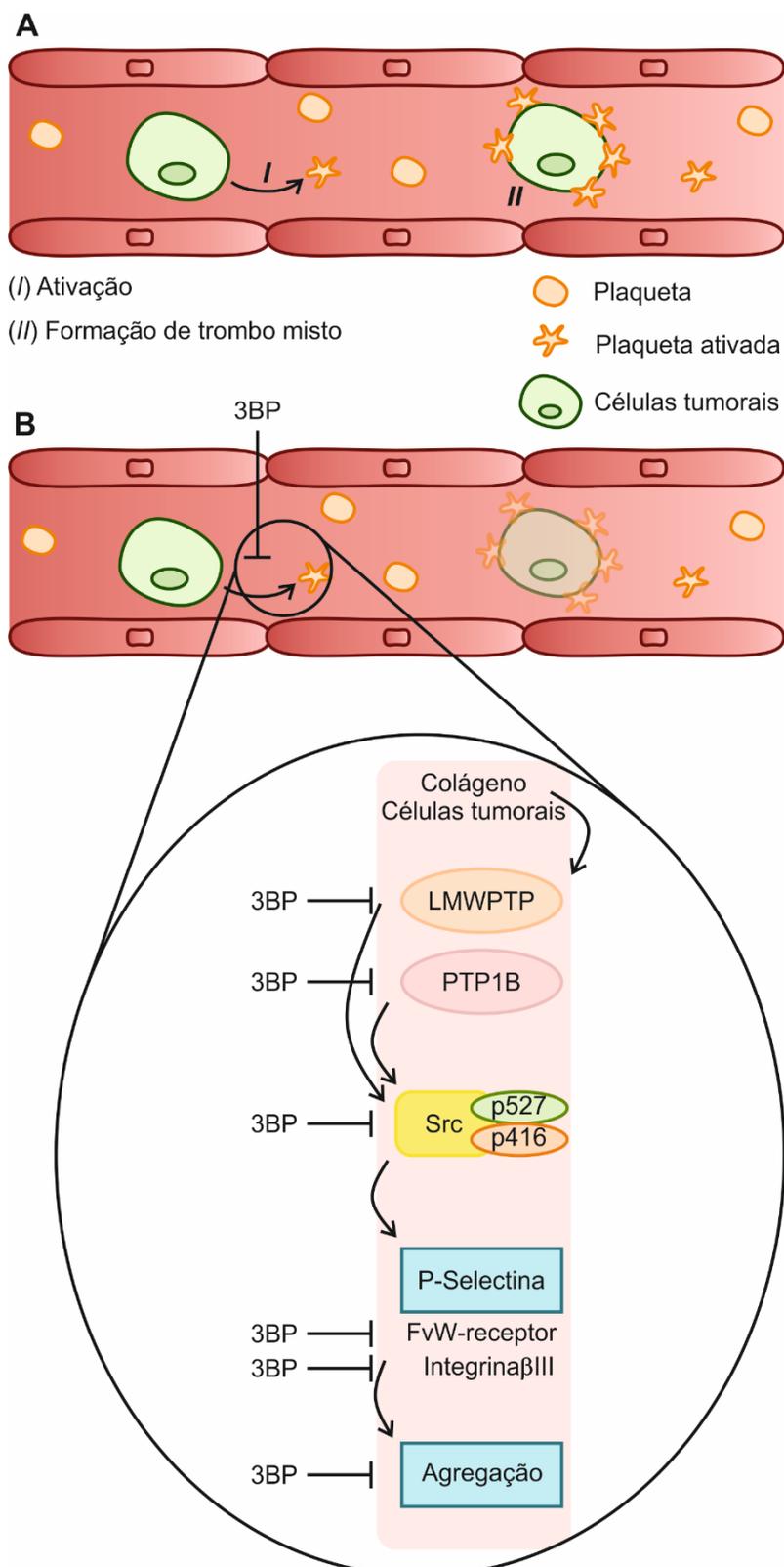


Figura 25. Etapas da agregação plaquetária afetadas pela 3-Bromopiruvato revelados por este estudo. (A) O agonista colágeno e células tumorais ativam a agregação de plaquetas. (B) Na presença do 3BP, duas proteínas tirosina fosfatases são alvos deste composto, as quais se tornam inibidas. Portanto, o 3BP ao diminuir a função plaquetária, surge como forte candidato para diminuir a formação de trombos, incluindo trombos-mistos proveniente da interação célula tumoral-plaquetas.

Figura 26. Gráficos de agregação plaquetária. Gráficos representativos de cada experimento de agregação plaquetária combinados em uma única figura.

I) Tratamento de plaquetas com colágeno ou ristocetina na ausência presença de inibidor de Src, PP2;

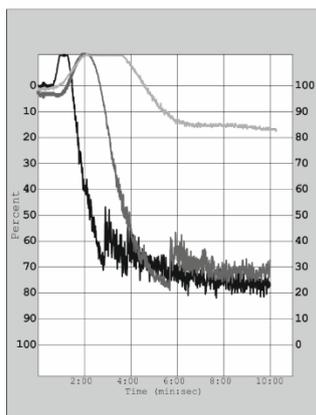
II) Tratamento de plaquetas com colágeno ou ristocetina na ausência ou presença de 3BP;

III) Tratamento de plaquetas com colágeno na ausência ou presença de inibidores de PTP1B (CinnGEL) ou SHP (NSC87887);

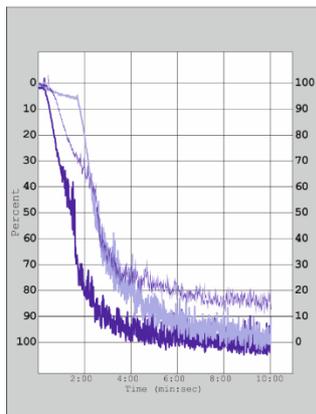
IV) Tratamento de plaquetas de indivíduos sadios ou pacientes com colágeno ou ristocetina;

V) Tratamento de plaquetas de indivíduos sadios ou pacientes com colágeno ou ristocetina na ausência ou presença de 3BP.

I

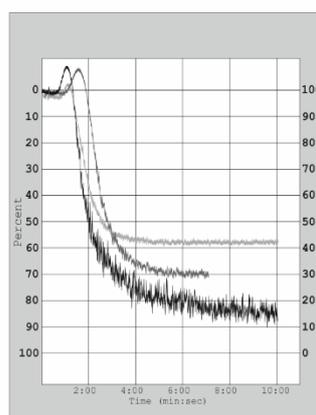


— Colágeno 2µg/mL
 — Colágeno 2µg/mL + PP2 10µM
 — Colágeno 2µg/mL + PP2 20µM

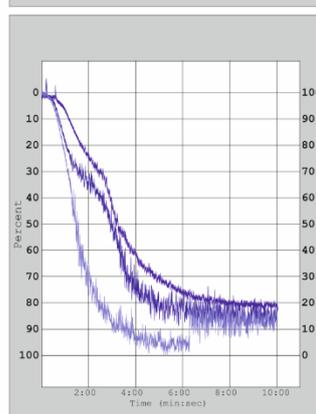


— Ristocetina 1.25mg/mL
 — Ristocetina 1.25mg/mL + PP2 10µM
 — Ristocetina 1.25mg/mL + PP2 20µM

II

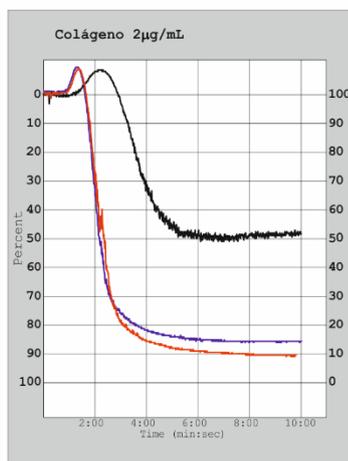


— Colágeno 2µg/mL
 — Colágeno 2µg/mL + 3BP (50µM)
 — Colágeno 2µg/mL + 3BP (100µM)



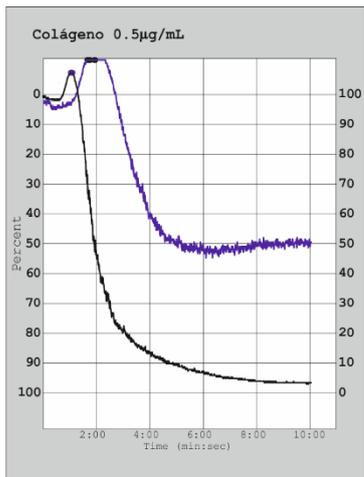
— Ristocetina 1.25mg/mL
 — Ristocetina 1.25mg/mL + 3BP (50µM)
 — Ristocetina 1.25mg/mL + 3BP (100µM)

III

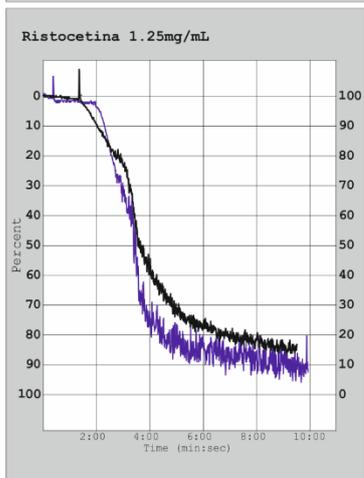


— Controle
 — CinnGEL 10µM
 — NSC87887 100µM

IV

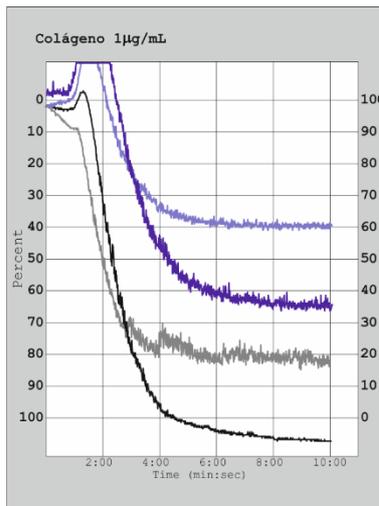


TEPH
TEP



TEPH
TEP

V



TEPH
TEPH + 3BP (100uM)
TEP
TEP + 3BP (100uM)

4.2. Plaquetas atuam na biologia de células de câncer de colorretal: migração e nível da LMWPTP

4.2.1. Influência das plaquetas em dois parâmetros das células de câncer colorretal: nível da LMWPTP e capacidade de migração em cultura 2D

No contexto do câncer, a importância das plaquetas como adjuvante na progressão desta doença tem sido reportada, como foi descrito anteriormente em câncer de mama (Labelle et al, 2014; Andrade et al, 2016). De fato, a presença de plaquetas em co-cultura *in vitro* provocou mudança na morfologia de células de câncer de mama, com perfil de transição epitélio-mesênquima (Labelle et al, 2011). A relação direta entre LMWPTP e eventos de migração *in vitro* em câncer colorretal foi descrita anteriormente (Hoekstra et al, 2015), entretanto, a avaliação desse fenômeno associado à presença de plaquetas ainda precisava ser investigado..Sendo assim, foi feita uma primeira avaliação da expressão de LMWWPTP em células HCT116, na presença e ausência de plaquetas. De fato, ao observar os experimentos realizados com a linhagem celular HCT116 na presença de plaquetas observamos aumento na expressão de LMWPTP analisada por imunofluorescência (**Figura 27A-B** – análise conforme Faria et al, 2020). De forma interessante, também foi feita a investigação do comportamento de células HCT116, em experimento de formação de ferida, e foi observado aumento na capacidade migratória dessa célula (formação de ferida – **Figura 27C-D**). Nesse sentido, é possível sugerir que o aumento na expressão de LMWPTP provocado pela presença de plaquetas acarreta em aumento na migração celular (84,2% de fechamento de ferida na presença de plaquetas, comparado a 66% na ausência de plaquetas).

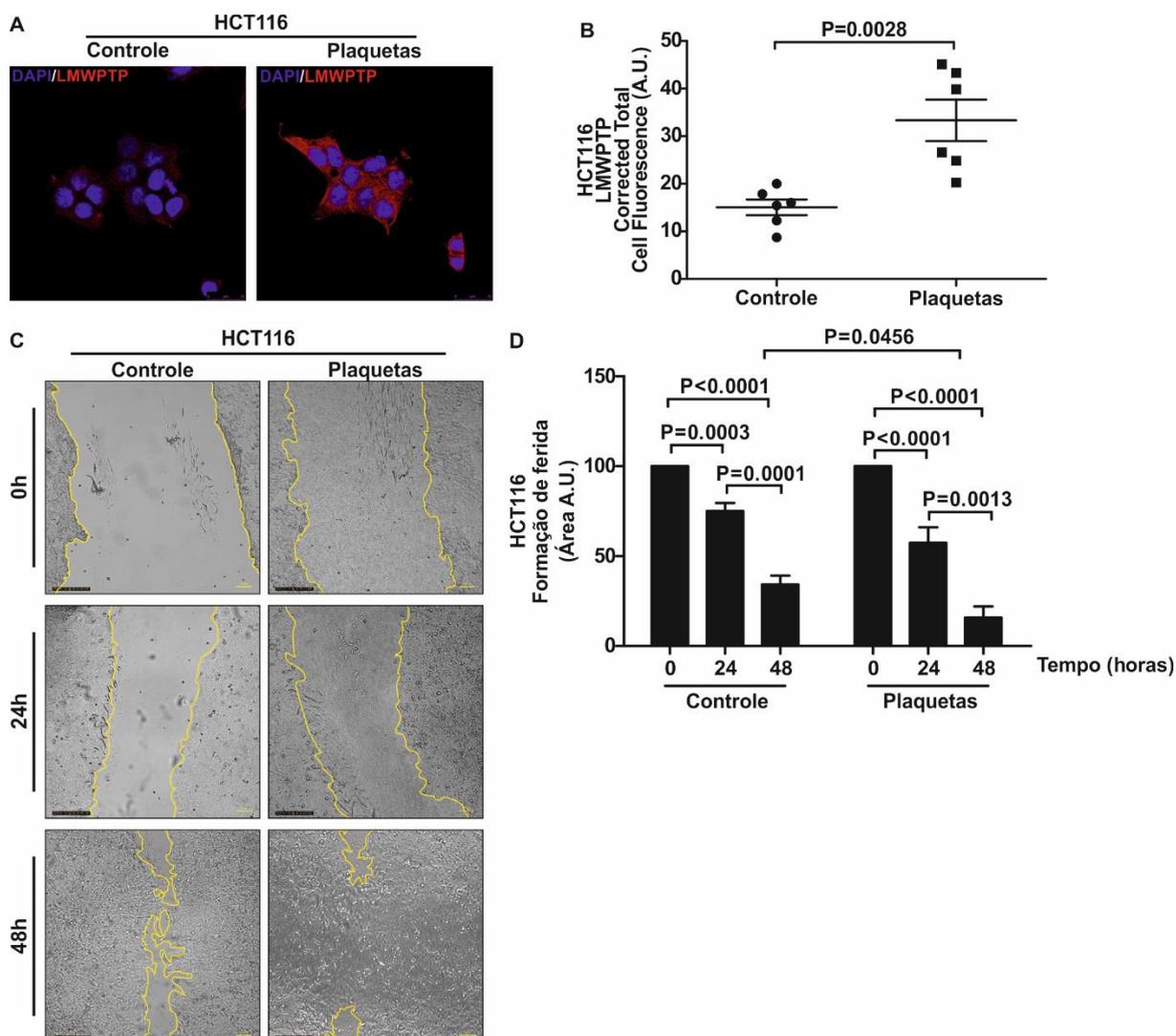


Figura 27. Expressão de LMWPTP em HCT116 na presença de plaquetas promove migração celular em HCT116. (A) Imunofluorescência confocal para LMWPTP (vermelho) e núcleo (DAPI, azul) na presença e ausência de plaquetas. Magnificação de 100X (barra de escala 25 μ m). (B) Quantificação da fluorescência de LMWPTP referente à (A). As imagens são representativas dos experimentos realizados. (C) Ensaio de formação de ferida (migração) na presença e ausência de plaquetas. Microscopia de contraste de luz em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). (D) Quantificação do ensaio de formação de ferida referente à (A). As imagens são representativas dos experimentos realizados.

A fim de aprofundar as observações em HCT116, seguimos com a investigação em mais uma linhagem tumoral, HT29. Em modelo de cultura 2D, HT29 não apresentou diferença na expressão de LMWPTP quando comparado presença e ausência de plaquetas (**Figura 28A-B** - análise conforme Faria et al, 2020), bem como não houve aumento na migração celular (**Figura 28C**), uma vez que não foi observada diferença estatística (**Figura 28D**). Além disso, na presença de plaquetas, não houve diferença na taxa de proliferação celular de HT29, fato que também foi

relatado em estudo recente de Plantureux e colaboradores (Plantureux et al, 2020) – (Figura 28E).

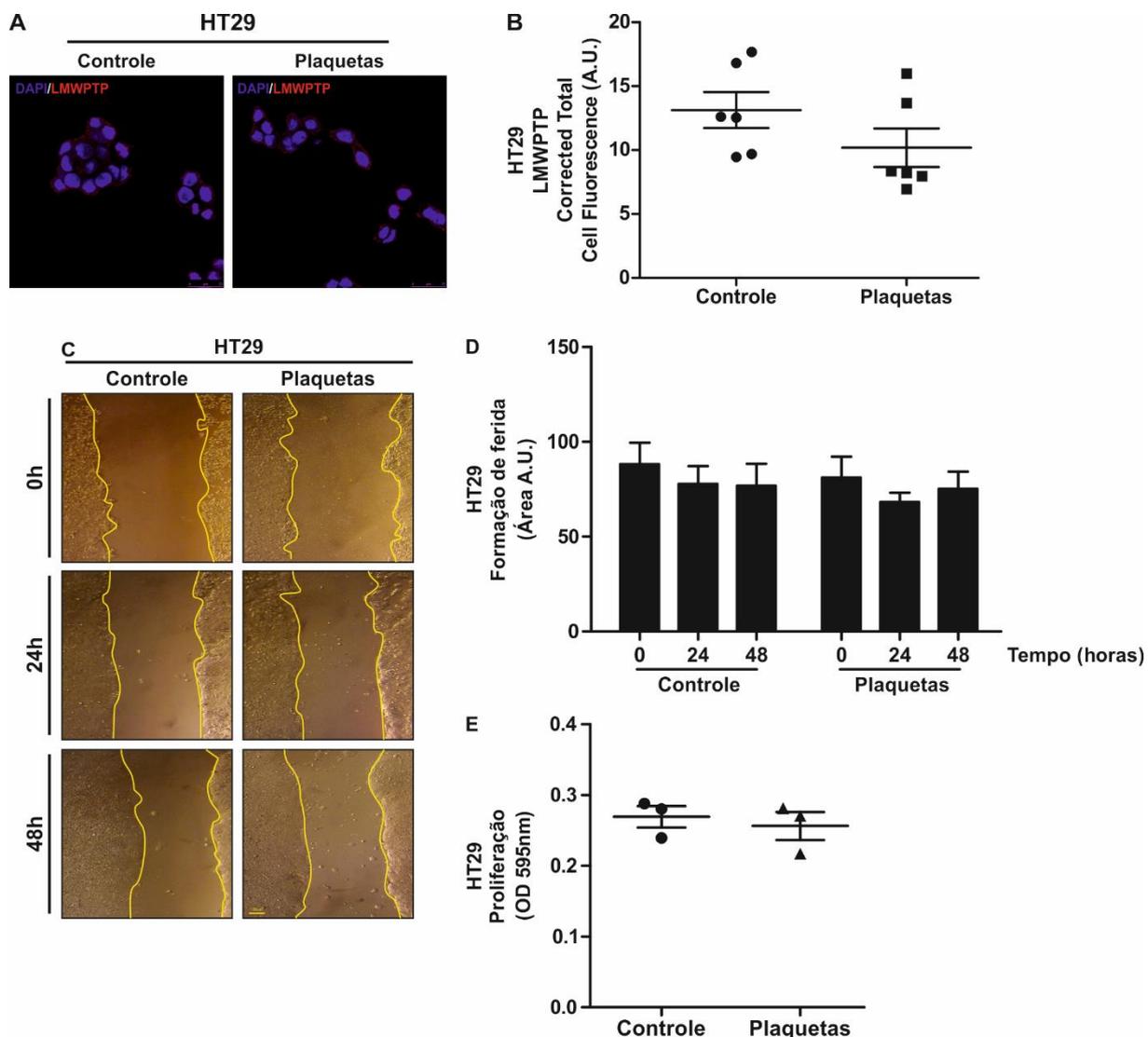


Figura 28. Presença de plaquetas em HT29 não favorece migração e/ou proliferação. (A) Imunofluorescência confocal para LMWPTP (vermelho) e núcleo (DAPI, azul) na presença e ausência de plaquetas. Magnificação de 100X (barra de escala 25 μ m). (B) Quantificação da fluorescência de LMWPTP referente à (A). (C) Ensaio de formação de ferida (migração) na presença e ausência de plaquetas. Microscopia de contraste de luz em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). (D) Quantificação do ensaio de formação de ferida referente à (C). (E) Ensaio de viabilidade celular por MTT na presença e ausência de plaquetas. As imagens são representativas dos experimentos realizados.

4.2.2. Influência das plaquetas na morfologia e formação de esferoides derivados de células de câncer colorretal

A utilização de modelos de cultura 3D vem recebendo destaque nos últimos anos (Nath & Devi, 2016). Esferoides são obtidos a partir de cultura de linhagens celulares imortalizadas, que ao serem cultivadas em ambientes de baixa adesão celular ou em matrizes específicas, apresentam organização em formato de esferas transiente e maciça (Ishiguro et al, 2017). Modelos 3D (esferoides) mimetizam a biologia do tumor *in vivo*, a partir da criação de um microambiente tumoral, com condições de crescimento das células tumorais que permite estruturação com maior as interações célula-célula e célula-matriz, além de apresentarem zonas (áreas) contendo diferença em gradiente de concentração de nutrientes e oxigênio (Cukierman et al, 2001; Nyga et al, 2011; Ware et al, 2016; Lee and Bissell, 2018). Portanto, modelos 3D têm servido para descoberta e validação da atividade farmacológica, toxicidade de candidatos a fármacos e para melhor entendimento da progressão tumoral (Pampaloni et al, 2007). Esferoides grandes (> 500 µm de diâmetro) são capazes de mimetizar propriedades de tumores sólidos humanos com tamanhos de 0.5 a 1.0mm³ (Nath & Devi, 2016). Essas propriedades influenciam o efeito terapêutico de vários fármacos nos esferóides, por meio de mecanismos semelhantes encontrados em tumores sólidos humanos *in vivo*, dentre os quais merecem destaque: hipóxia, reprogramação do metabolismo energético e gradiente de pH (Nunes et al, 2019). Como por exemplo, Wenzel e colaboradores (2014) identificaram substâncias que induzem seletivamente a morte celular no núcleo hipóxico do tumor a partir da realização de uma triagem em larga escala em modelos de esferoides.

Os principais parâmetros observados em análise de esferoides são a arquitetura e estrutura, com o objetivo de determinar a morfologia do esferoide formado (Balmaña et al, 2018). Segundo o grupo de pesquisa da Profa. M.J. Bissell, referência em cultura 3D, os padrões de crescimento de esferoides tumorais foram divididos de acordo com a morfologia dos mesmos: (i) redondo, com esferoide maciço e bem delineado; (ii) massa, com esferoide delineado, mas núcleo desorganizado; (iii) cacho de uva, com células organizadas de forma irregular e levemente separadas; (iv) e estrelados, que mostram prolongamentos indicativos de fenótipo invasivo (Kenny et al, 2007). Segundo descrito em Riedl et al, 2017, a estrutura de esferoides de HCT116 em 24 horas de cultivo apresentaram morfologia

menos compactada, e de fato, observa-se o mesmo perfil nos esferoides obtidos neste trabalho (**Figura 29A** – controle 24 horas). É possível observar que 120 horas após o plaqueamento, o formato de esferoide na ausência de plaquetas (controle) é centralizado e maciço, enquanto na presença de plaquetas (plaquetas) é difuso (**Figura 29A**). Essas alterações morfológicas indicam perfil migratório na presença de plaquetas pela formação de prolongamentos a partir do esferoide principal – formato estrelar conforme descrito em Kenny et al, 2007.

A estrutura estrelar formada na presença de plaquetas fica mais evidente ao observar a marcação para actina (faloidina) nos esferoides de HCT116 (**Figura 29B**), quando comparado à estrutura densa e uniforme do esferoide de HCT116 sem plaquetas, principalmente ao observarmos a área de marcação de fluorescência desses esferoides: presença de plaquetas (área 129.78 ± 10.14 U.A.) vs. ausência de plaquetas (área 38.71 ± 8.67 U.A.). Esse resultado sugere que a formação de estrutura 3D difusa na presença de plaquetas é suportada pela presença das mesmas através da formação de uma rede de componentes importantes de matriz extracelular. Fato também observado por Andrade e colaboradores no modelo de câncer de mama (Andrade et al, 2016). Essa rede orienta o perfil estrelar e alicerça os prolongamentos do esferoide. De forma interessante, em trabalhos descritos anteriormente na literatura, foi atribuída uma maior capacidade de formação de redes de fibrina em co-cultura de célula tumoral-plaqueta, e esse perfil foi associado a maior capacidade de formação de novos vasos (angiogênese) em câncer de mama (Andrade et al, 2017; Pavlovic et al, 2019). Nesse sentido, a formação de rede de fibrina poderia suportar a migração de células de câncer colorretal em cultura 3D.

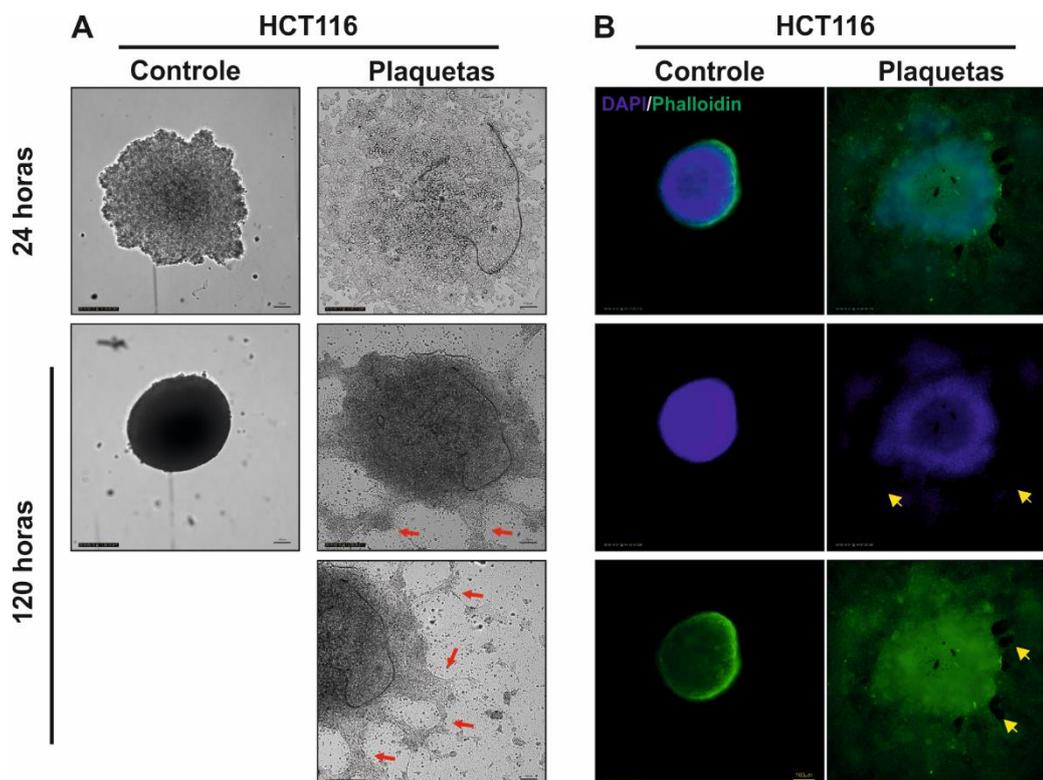


Figura 29. Formação de esferoide de células HCT116. (A) Células HCT116 foram plaqueadas de acordo com Souza et al, 2010 para formação de esferoides na presença e ausência de plaquetas. Microscopia de contraste de luz em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). Setas vermelhas, indicação dos prolongamentos a partir do esferoide principal. (B) Foi feita marcação com anticorpo específico de citoesqueleto (faloidina) e nuclear (DAPI). Setas indicam a ausência de células (pela marcação nuclear de DAPI) e presença de plaquetas (pela marcação de membrana por faloidina). Microscopias de imunofluorescência em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). As imagens são representativas dos experimentos realizados.

Em relação à expressão de LMWPTP nos esferoides, a primeira análise indica que houve diminuição na expressão de LMWPTP presença (plaquetas – intensidade de imunofluorescência 143.72 ± 65.39 U.A.) e ausência (controle – intensidade de imunofluorescência 219.12 ± 26.87 U.A.) de plaquetas (**Figura 30A**). Entretanto, esse fato pode ser atribuído a menor capacidade de difusão dos anticorpos no esferoide, provavelmente pela presença da rede de fibrina (Perez et al, 2014) construída pela ativação plaquetária na presença de células tumorais (van der Spuy e Augustine, 2016). A deposição de componentes da matriz extracelular é modificada por células tumorais, como, por exemplo, construção linear de rede de colágeno (Jia et al, 2019), e plaquetas estimulam a modificação de deposição de matriz extracelular. A menor difusão de anticorpos é exemplificada pela aparente diferença de intensidade de fluorescência de marcador nuclear (DAPI) comparando esferoides na presença e ausência de plaquetas (**Figura 30B**). Além disso, a

organização difusa das células em esferoides com plaquetas também levou a difusão de marcação nuclear levando a “diluição” da intensidade e falso positivo a análise de intensidade de fluorescência. Como solução do problema, foi feita a normalização da análise pela média da área de marcação nuclear (DAPI), e obtivemos a expressão de LMWPTP pela intensidade de imunofluorescência em esferoides controle de 497.47 ± 95.32 U.A. e intensidade de imunofluorescência em esferoides com plaquetas de 658.73 ± 5.50 U.A.. Sendo assim, é possível observar maior expressão de LMWPTP na cultura 3D na presença de plaquetas, assim como foi observado na cultura 2D.

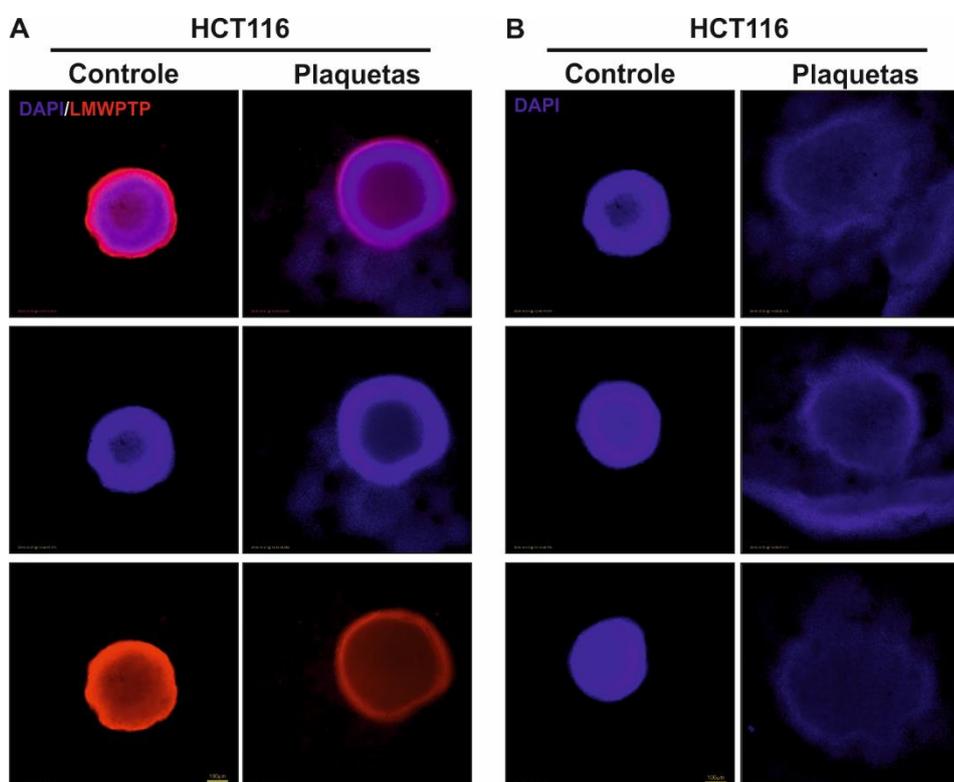


Figura 30. Imunofluorescência de esferoide de células HCT116 marcação de LMWPTP. (A) Expressão de LMWPTP (vermelho) e marcação nuclear (DAPI) em esferoides de HCT116. Microscopias de imunofluorescência em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). (B) Exemplificação da marcação nuclear dos esferoides de HCT116. Microscopias de imunofluorescência em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). As imagens são representativas dos experimentos realizados.

4.2.3. Efeito de plaquetas em células HT29 na formação de esferoides

O padrão de crescimento das células HT29 em “ilhas” (Luca et al, 2013) favorece a formação de colônias, conforme observamos no ensaio de formação de esferoide 3D (**Figura 31**) e formação de colônias, também conhecido como formação de esferoide 2D (Kobayashi et al, 2019) – (**Figura 31B-C**) na presença de plaquetas. Além disso, a diferença encontrada entre os experimentos 2D (microscopia, formação de ferida e MTT) com formação de esferoide (2D e 3D) poderia ser explicado pela preferência das células HT29 crescerem dessa forma agrupada, sendo o ambiente 3D fisiologicamente mais adequado para essas células. O crescimento de pequenos esferoides na presença de plaqueta poderia ser atribuído a maior capacidade de formação de sítios secundários metastáticos, uma vez que foi observado resultado semelhante em câncer de ovário (Orellana et al, 2015).

Além do padrão diferente de formação de esferoides na presença de plaquetas, houve menor formação de camada gelatinosa (que sugerimos ser formada de matriz extracelular e fibrina) – (**Figura 31D**). Também, foi possível observar que os esferoides formados na presença de plaquetas são cobertos por uma camada de plaquetas, uma vez que a marcação de actina (faloidina) aparece na ausência da marcação nuclear (DAPI) – (**Figura 31D**). É esperado que a marcação nuclear de plaquetas fosse negativa pela ausência de núcleo nesses componentes sanguíneos (Rumbaut & Thiagarajan, 2010).

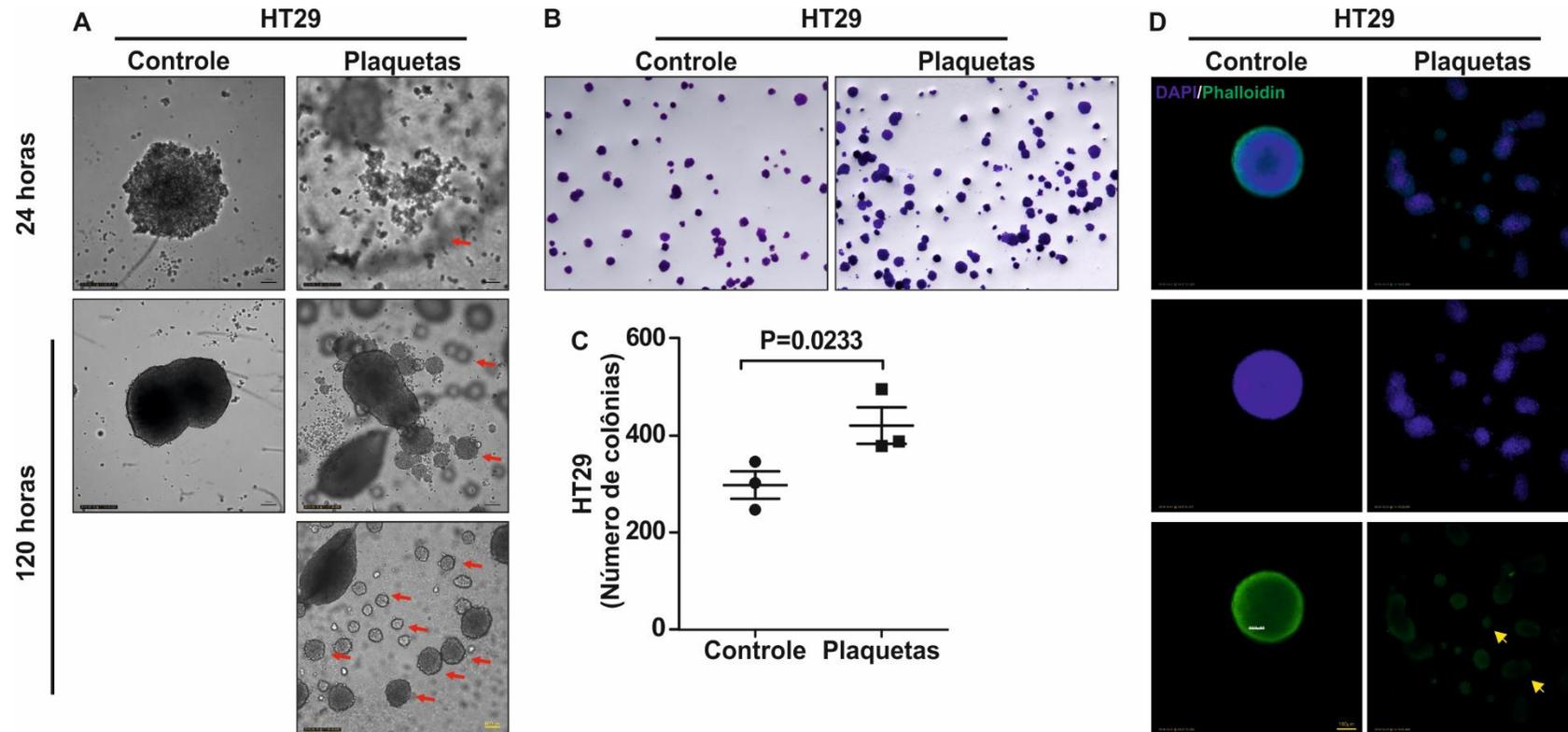


Figura 31. Formação de esferoides em HT29 na presença e ausência de plaquetas. Microscopia de contraste de luz em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). (B-C) Formação de colônia na presença e ausência de plaquetas. (C) Quantificação da formação de colônias através da contagem do número bruto de cada experimento realizado. Microscopia de formação de colônia em magnificação 2X. (D) Imunofluorescência de esferoide de células HT29 marcação de citoesqueleto. Foi feita coloração com anticorpo específico de citoesqueleto (faloidina) e nuclear (DAPI). Microscopias de imunofluorescência em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). As imagens são representativas dos experimentos realizados.

A marcação para LMWPTP em esferoides com plaquetas pode ser interpretada corretamente, pois, apesar da eventual adesão de plaquetas na parte externa do esferoide, observa-se boa distribuição de anticorpos no esferoide formado. Nesse sentido, a expressão de LMWPTP aumentou (**Figura 32A-B**) nos esferoides de HT29 na presença de plaquetas, principalmente na zona mais externa desses esferoides. A permeabilidade de anticorpos foi considerada adequada conforme observamos semelhança na intensidade de marcação nuclear (DAPI) na presença (intensidade de imunofluorescência 101.30 ± 41.24 U.A.) e ausência (intensidade de imunofluorescência 127.32 ± 13.15 U.A.) de plaquetas (**Figura 32C**).

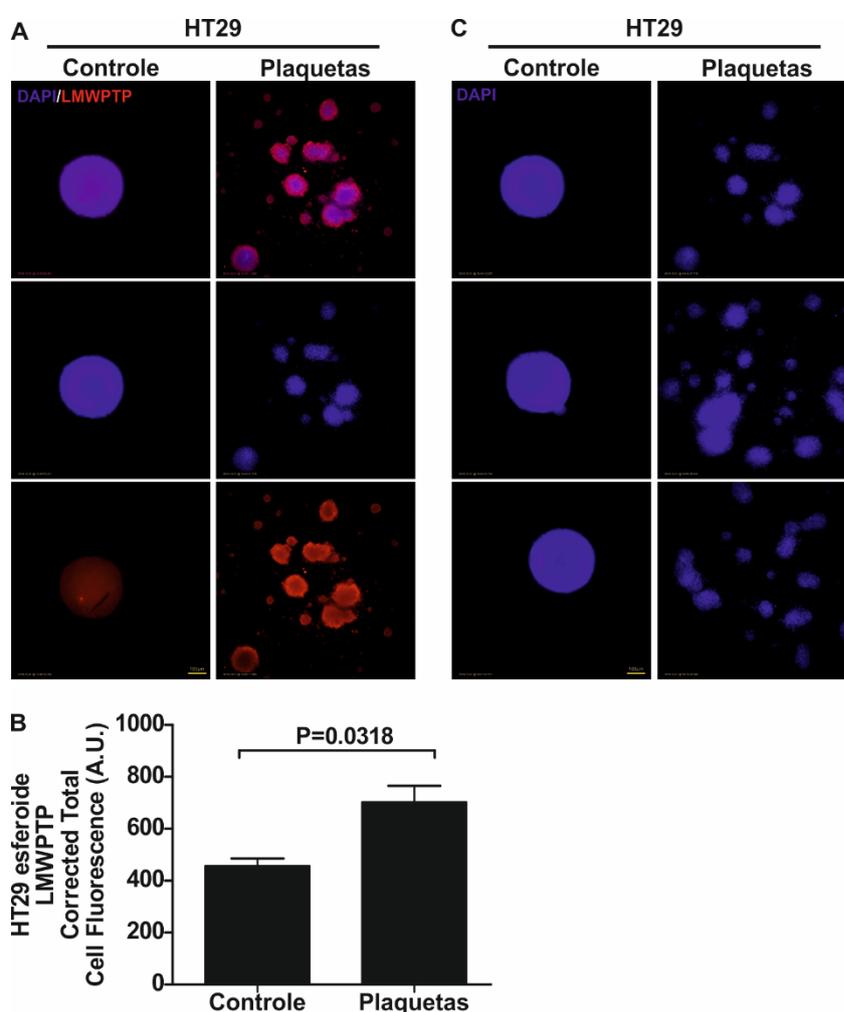


Figura 32. Imunofluorescência de esferoide de células HT29 com marcação de LMWPTP. (A) Expressão de LMWPTP (vermelho) e marcação nuclear (DAPI) em esferoides de HT29. (B) Quantificação da expressão de LMWPTP por fluorescência. Microscopia de contraste de luz em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). (C) Imunofluorescência de esferoide de células HT29 marcação nuclear. Microscopias de imunofluorescência em magnificação de 10X (barra de escala 100 μ m). As imagens são representativas dos experimentos realizados.

4.2.4. Resposta das células LMWPTP silenciadas frente à co-cultura na presença de plaquetas

Com base nos resultados obtidos até o momento, foi observado que plaquetas contribuem efetivamente para a malignidade de células tumorais por: promover proliferação e migração celular. Utilizando-se de células silenciadas com a técnica Crispr-Cas9 (**Figura 33A**) e lentivírus para LMWPTP (**Figura 34A**) para validar os resultados de efeito de plaquetas em células tumorais, foi investigada formação de colônia com células HT29 *wild type* e HT29 LMWPTP KD (**Figura 33A**) indica formação de colônias maiores na presença de plaquetas tanto em HT29 WT quanto KD (**Figura 34B-D**). Entretanto, o tamanho das colônias das células KD na presença de plaquetas é menor que das células WT, indicando menor capacidade de formação de esferas das células silenciadas (**Figura 33B**). No caso de HCT116 shScramble e shLMWPTP (**Figura 34A**), menor número de colônia é formado na linhagem silenciada (**Figura 33B-C**), e quando comparado com a presença de plaquetas, a linhagem silenciada formou colônias menores (**Figura 34B-D**).

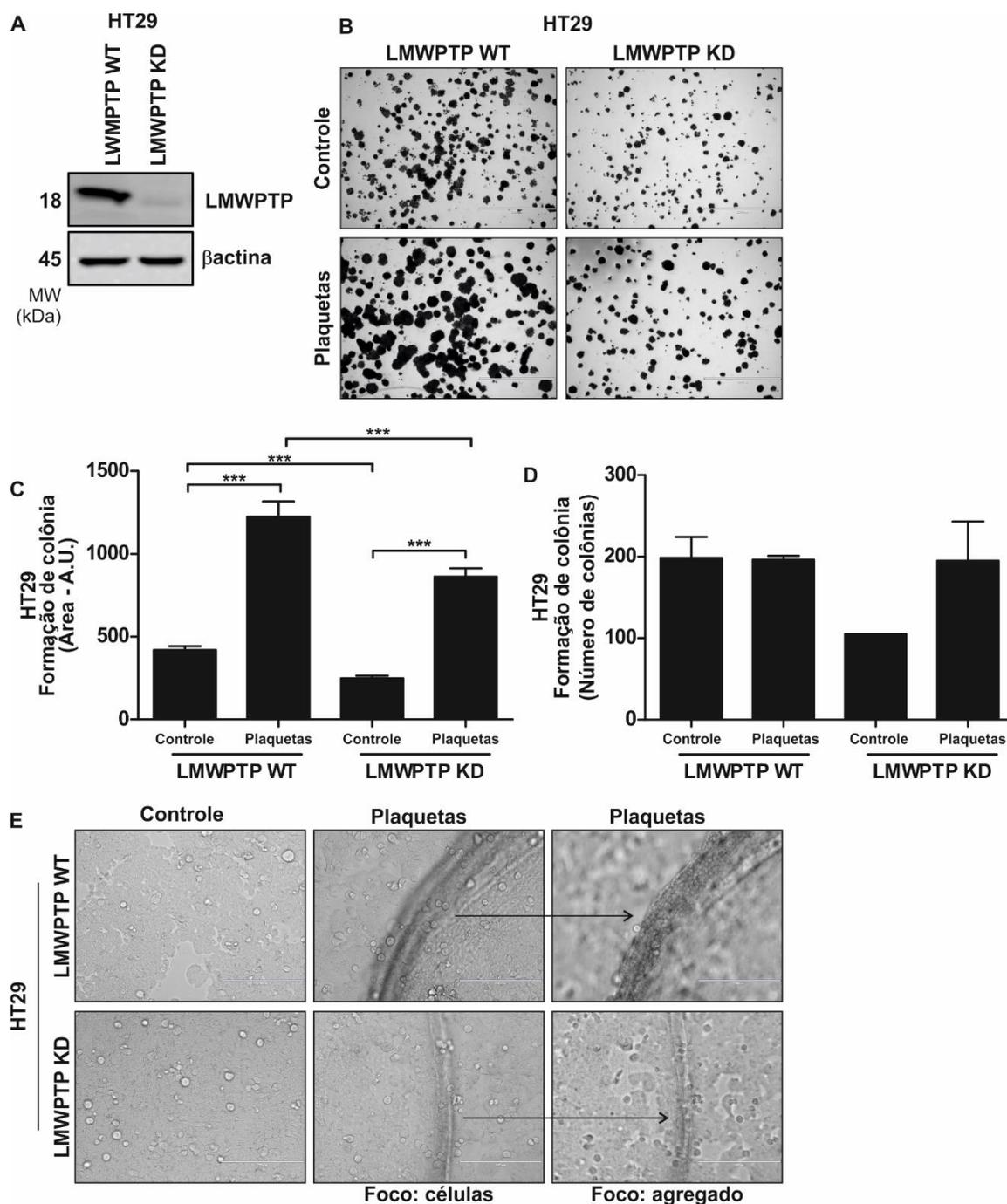


Figura 33. LMWPTP *knockdown* contribui, para em parte, diminuir formação de colônias em células HT29. (A) Expressão de LMWPTP nas células HT29 *wild type* (WT) e silenciada para LMWPTP a partir da aplicação de tecnologia CRISPR (LMWPTP KD). β -actina foi utilizada como controle interno. (B-D) Formação de colônias em HT29 *wild type* (WT) e silenciada para LMWPTP a partir da aplicação de tecnologia CRISPR (LMWPTP KD). (B) Formação de colônia na presença e ausência de plaquetas. Quantificação da formação de colônias através da contagem do número bruto de cada experimento realizado (C) e área (D). Microscopia de formação de colônia em magnificação 2X. As imagens são representativas dos experimentos realizados. (E) Co-cultura de células tumorais HT29 LMWPTP WT e LMWPTP KD e plaquetas visualizadas em microscópio. Magnificação de 10X (barra de escala 400 μ m). As imagens são representativas dos experimentos realizados.

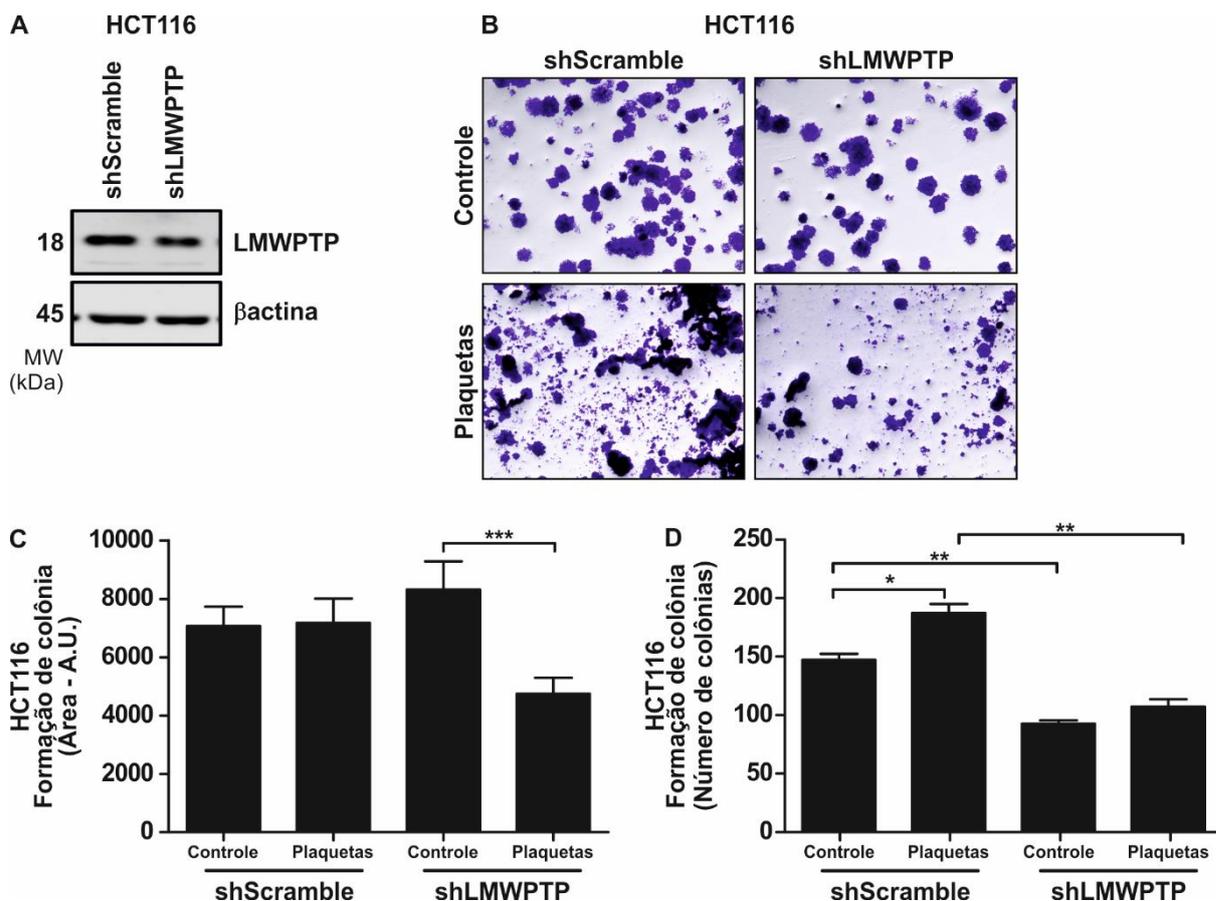


Figura 34. Formação de colônia em HCT116 shScramble e shLMWPTP. (A) Expressão de LMWPTP nas células HCT116 shScramble e shLMWPTP a partir da aplicação de tecnologia lentivírus. β -actina foi utilizada como controle interno. (B) Formação de colônia na presença e ausência de plaquetas. (C-D) Quantificação da formação de colônias através da contagem do número bruto de cada experimento realizado (C) e área (D). Microscopia de formação de colônia em magnificação 2X. As imagens são representativas dos experimentos realizados.

4.2.5. Contribuição do estudo no contexto da literatura

Diversos trabalhos publicados, grande parte pelo nosso grupo de pesquisa, demonstram a relação direta entre super-expressão de LMWPTP com agressividade tumoral: resistência a quimioterápicos (Ferreira et al, 2012); mau prognóstico em pacientes com câncer de próstata (Ruela-de-Sousa et al, 2016). Conforme descrito anteriormente, a super-expressão de LMWPTP em células CRC contribui para perfil de migração celular, bem como foi observada maior expressão de LMWPTP em biópsias de pacientes com CRC metastático no fígado (Hoekstra et al, 2015). Sendo assim, em nosso estudo, foi observado que a partir da co-cultura plaquetas e células CRC houve aumento na expressão de LMWPTP intracelular. Nesse sentido, mostramos a capacidade de plaquetas, como componentes do microambiente

tumoral, em favorecer o perfil agressivo do tumor, ao contribuir para o aumento da expressão de LMWPTP.

A cooperação entre células tumorais e plaquetas ainda é um campo importante de investigação. Os dois principais efeitos da interação entre célula tumoral e plaqueta decorrem da (i) hiper-reatividade plaquetária a partir da ativação por células tumorais (descrita anteriormente), (ii) e a contribuição de plaquetas no microambiente tumoral. Plaquetas vêm sendo descritas como importantes “fábricas de fatores de crescimento” (Andrade et al, 2019), e de fato, plaquetas carregam diversas moléculas que diretamente suportam proliferação e sobrevivência tumoral. Plaquetas contribuem grandemente para alteração da morfologia em diversos tipos tumorais. Em câncer de mama, a presença de plasma-rico em plaquetas favoreceu a proliferação e promoveu ativação de perfil de transição epitélio-mesênquima (Andrade et al, 2017), através do contato direto entre células tumorais e plaquetas (Labelle et al, 2011), e por *delivery* de diversos fatores, com o TGF- β . O sobrenadante de plaquetas ativadas por agonistas de PAR-1 e PAR-4 também foi capaz de estimular alterações em células de câncer de mama pela ativação de quinases pró-sobrevivência PI3K e PKC, e angiogênese (Jiang et al, 2017). Em células de hemangioendotelioma hepático, o contato direto entre plaquetas e tumores também foi descrito por induzir a proliferação de células tumorais, a partir de integrina β 3, presente na superfície de plaquetas, que promoviam a ativação de PI3K (Gu et al, 2017). Além disso, a presença de plaquetas induziu a migração e invasão em câncer hepático (Carr et al, 2014), bem como suportam a formação de sítios secundários, conforme observado em câncer de ovário a maior número de esferoides formados na presença de plaquetas (Orellana et al, 2015). Em relação a eventos intracelulares, a presença de plaquetas no microambiente tumoral promoveu eventos metastáticos a partir da redução de *anoikis*, o tipo de morte celular que ocorre em células que desprendem da matriz extracelular (Haemmerle et al, 2018).

Plaquetas como parte do microambiente tumoral promovem a proliferação celular, conforme foi observado nos modelos 2D, 3D e em formação de colônia. Além disso, os nossos resultados mostram que plaquetas induzem um fenótipo migratório, em cultura 2D e 3D de CRC, que aparentemente tem correlação direta com a expressão de LMWPTP. Além disso, células com diferente expressão de LMWPTP apresentam comportamento menos proliferativo na presença de

plaquetas, bem como menor capacidade de ativação plaquetária. Sendo assim, os dados reforçam a capacidade de plaquetas como parte do microambiente tumoral em promover proliferação e migração, em parte, por uma sinalização dependente de LMWPTP.

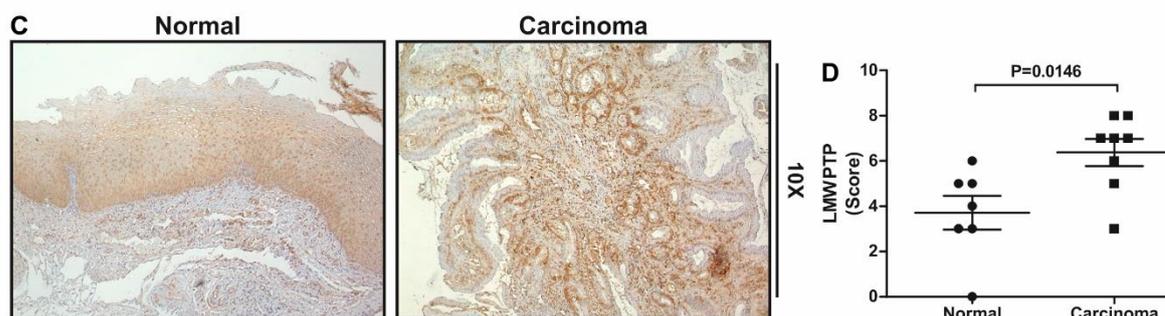
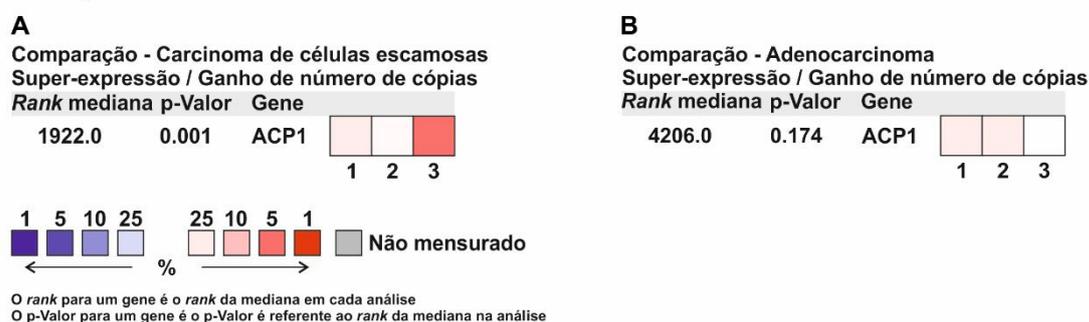
4.3. LMWPTP: assinatura biológica em tumores gastrointestinais

A incidência de câncer cresce rapidamente em todo o mundo. Câncer que acomete o trato gastrointestinal (esôfago, estômago, colon e reto) representaram 18,9% de novos casos em 2018 (Bray et al, 2018). Apesar dos avanços na detecção e tratamento de câncer do trato gastrointestinal, a incidência de mortalidade continua alta, com a taxa de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 20%, 30% e 15% para câncer de esôfago, câncer de estômago e CRC, respectivamente (Howlader et al, 2013; Alsop & Sharma, 2016; Zhou et al, 2017). A fim de compreender e reforçar a importância de LMWPTP em tumores do trato gastrointestinal, foi feita análise de *ACP1* mRNA, bem como análise de expressão de LMWPTP em tecidos de biópsia de tecidos normais e tumorais a partir de dados publicados em repositórios públicos. Dados depositados em Oncomine estão disponíveis como plataforma de bioinformática para a *mining* de dados de câncer de todo o mundo (Rhodes et al, 2004). Para o desenvolvimento deste trabalho, foi feita a busca em amostras de pacientes em expressão/*copynumber gain* em tecidos de câncer de esôfago, estômago e colorretal.

Dados de transcriptoma depositados em repositórios públicos em GEO (NIH, EUA) e não representados em Oncomine foram pesquisados. Foi observado um discreto aumento de *ACP1* mRNA em câncer de esôfago em Oncomine, entretanto, não foram encontrados dados extras em GEO *Dataset*, e é observada diferença significativa em carcinoma de células escamosas de esôfago (**Figura 35**). Foi observado um discreto aumento de *ACP1* mRNA em câncer de estômago em Oncomine, o que foi reforçado pelos dados em três dados depositados em GEO. GEO *Dataset Record* GSE13861 (transcript 201629_s_at) comparou 71 amostras de tecido de câncer de estômago com 19 tecidos normais (Cutcutache et al, 2016), GSE35809 (transcript U25849_at) comparou 3 amostras de tecido de câncer de estômago com 10 tecidos normais (Shi et al, 2017), GSE2685 (transcript 201630_s_at) comparou 22 amostras de tecido de câncer de estômago com 8 tecidos normais (Hippo et al, 2002) – (**Figura 36**). Em adição aos dados de estômago, foi feita a comparação de 33 dados publicados em Oncomine, confirmando a maior expressão de LMWPTP em CRC comparado com tecidos normal de cólon. GEO *Dataset Record* GSE24514 (transcript 201630_s_at) comparou 34 amostras de tecido de câncer de estômago com 15 tecidos normais

(Alhopuro et al, 2012) – (Figura 37). Dados anteriores de colaboradores do nosso grupo mostram que em amostras de CRC há aumento de expressão de LMWPTP (Hoekstra et al, 2015). Sendo assim, validamos com nova coorte os dados obtidos anteriormente (CRC) e incluímos a coorte com tecidos normal e tumoral de estômago. A partir da realização de imunohistoquímica, observa-se maior expressão de LMWPTP em carcinoma do trato gastrointestinal comparado com tecidos normais (Figura 33-35).

Esôfago



E

Esophageal Squamous Cell Carcinoma

1. Esophageal Squamous Cell Carcinoma vs. Normal
2. Esophageal Squamous Cell Carcinoma vs. Normal
3. Esophageal Squamous Cell Carcinoma vs. Normal

Hu Esophagus, BMC Genomics, 2010
 Hu Esophagus 2, Cancer Res, 2009
 Su Esophagus 2, Clin Cancer Res, 2011

Esophageal Adenocarcinoma

1. Esophageal Adenocarcinoma vs. Normal
2. Esophageal Adenocarcinoma vs. Normal
3. Esophageal Adenocarcinoma vs. Normal

Hao Esophagus, Gastroenterology, 2006
 Kim Esophagus, PLoS One, 2010
 Kimchi Esophagus, Cancer Res, 2005

Figura 35. Expressão de LMWPTP em câncer de esôfago. Foi feita a busca e análise de dados de transcriptoma em Oncomine™ a partir da busca por gene *ACP1* em (A-B) Oncomine™ com os números correspondentes de cada estudo na subtabela (A) para Esophageal Squamous Cell Carcinoma e (B) Adenocarcinoma. (C-D) O número de amostras analisadas para esôfago foi: normal (n=7) e carcinoma (n=8), e a figura mostra lâminas representativas (aumento 10X). A intensidade e proporção foram classificadas de acordo com descrito por Allred et al, 1998 e estatística apresentada em (D). Os números embaixo de cada quadrado de (A) e (B) representam as referências que estão descritas na tabela abaixo em (E).

Estômago

A

Comparação

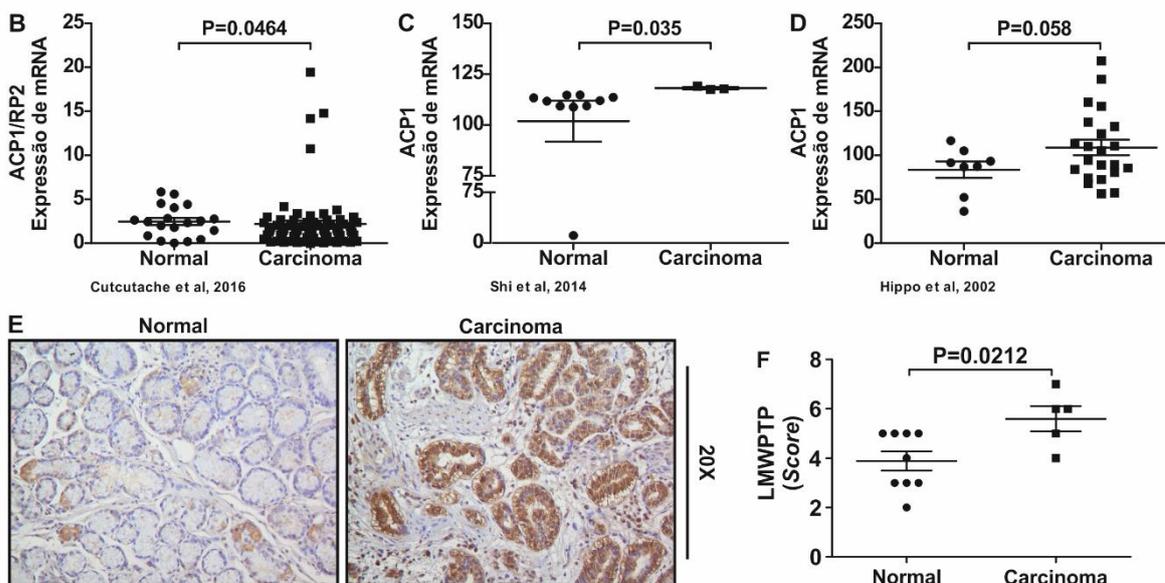
Super-expressão / Ganho número de cópias

Rank mediana p-Valor Gene

Rank	p-Valor	Gene
6992.0	0.055	ACP1



O rank para um gene é o rank da mediana em cada análise
O p-Valor para um gene é o p-Valor referente ao rank da mediana na análise



G

1. Diffuse Gastric Adenocarcinoma vs. Normal
2. Gastric Intestinal Type Adenocarcinoma vs. Normal
3. Gastric Mixed Adenocarcinoma vs. Normal
4. Diffuse Gastric Adenocarcinoma vs. Normal
5. Gastric Adenocarcinoma vs. Normal
6. Gastric Intestinal Type Adenocarcinoma vs. Normal
7. Gastric Mixed Adenocarcinoma vs. Normal
8. Gastric Cancer vs. Normal
9. Gastric Adenocarcinoma vs. Normal
10. Gastric Cancer vs. Normal
11. Diffuse Gastric Adenocarcinoma vs. Normal
12. Gastric Intestinal Type Adenocarcinoma vs. Normal
13. Gastric Mixed Adenocarcinoma vs. Normal
14. Gastric Adenocarcinoma vs. Normal
15. Gastric Cancer vs. Normal

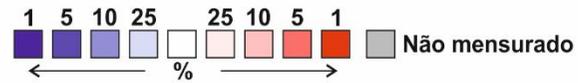
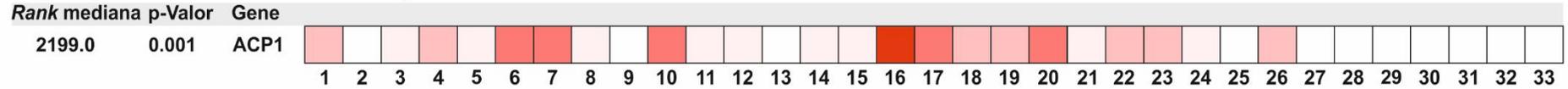
- Chen Gastric, Mol Biol Cell, 2003
Chen Gastric, Mol Biol Cell, 2003
Chen Gastric, Mol Biol Cell, 2003
Cho Gastric, Clin Cancer Res, 2011
Cui Gastric, Nucleic Acids Res, 2011
Deng Gastric, Gut, 2012
Deng Gastric, Gut, 2012
D'Errico Gastric, Eur J Cancer, 2009
D'Errico Gastric, Eur J Cancer, 2009
D'Errico Gastric, Eur J Cancer, 2009
TCGA Gastric, No Associated Paper, 2013
Wang Gastric, Med Oncol, 2010

Figura 36. Expressão de LMWPTP em câncer de estômago. Foi feita a busca e análise de dados de transcriptoma em Oncomine™ a partir da busca por gene *ACP1* em (A-B) Oncomine™ com os números correspondentes de cada estudo na subtabela em (A) e GEOdataset (B-D). (E) O número de amostras analisadas para estômago foi: normal (n=9) e carcinoma (n=5), e a figura mostra lâminas representativas (aumento 20X). A intensidade e proporção foram classificadas de acordo com descrito por Allred et al, 1998 e estatística apresentada em (F). Os números embaixo dos quadrados de (A) representam as referências que estão descritas na tabela abaixo em (G).

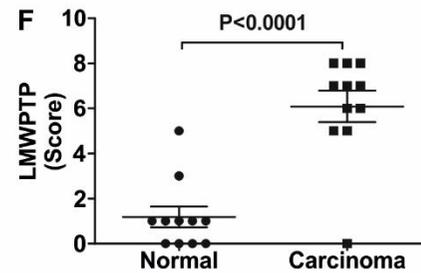
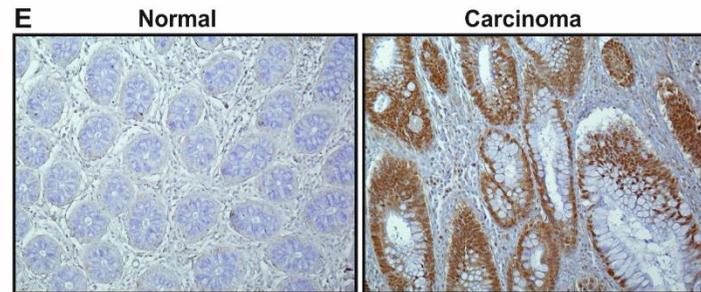
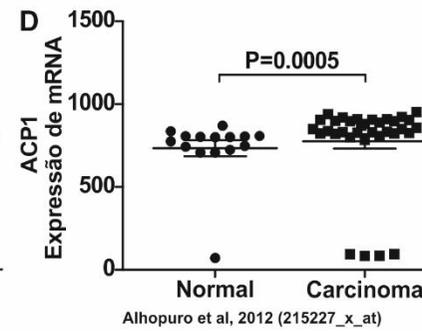
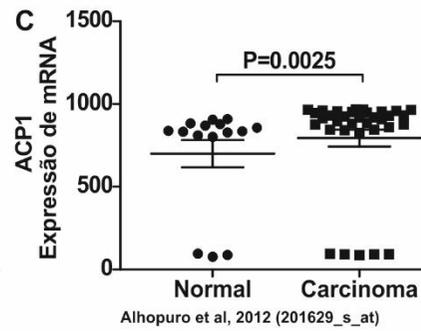
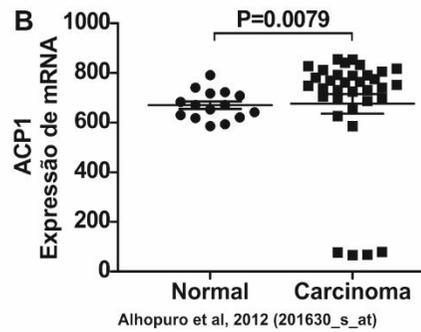
Colorretal

A

Comparação
Super-expressão / Ganho de número de cópias



O rank para um gene é o rank da mediana em cada análise
O p-Valor para um gene é o p-Valor é referente ao rank da mediana na análise



G

1. Colon Adenocarcinoma vs. Normal	Alon Colon, Proc Natl Acad Sci U S A, 1999
2. Rectal Adenocarcinoma vs. Normal	Gaedcke Colorectal, Genes Chromosomes Cancer, 2010
3. Colorectal Adenoma Epithelia vs. Normal	Gaspar Colon, Am J Pathol, 2008
4. Colorectal Carcinoma vs. Normal	Graudens Colon, Genome Biol, 2006
5. Colorectal Carcinoma vs. Normal	Hong Colorectal, Clin Exp Metastasis, 2010
6. Cecum Adenocarcinoma vs. Normal	Kaiser Colon, Genome Biol, 2007
7. Colon Adenocarcinoma vs. Normal	Kaiser Colon, Genome Biol, 2007
8. Colon Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal	Kaiser Colon, Genome Biol, 2007
9. Rectal Adenocarcinoma vs. Normal	Kaiser Colon, Genome Biol, 2007
10. Rectal Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal	Kaiser Colon, Genome Biol, 2007
11. Rectosigmoid Adenocarcinoma vs. Normal	Kaiser Colon, Genome Biol, 2007
12. Colon Adenocarcinoma vs. Normal	Ki Colon, Int J Cancer, 2007
13. Colon Adenocarcinoma vs. Normal	Kurashina Colon, Cancer Sci, 2008
14. Colon Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal	Kurashina Colon, Cancer Sci, 2008
15. Rectal Adenocarcinoma vs. Normal	Kurashina Colon, Cancer Sci, 2008
16. Colon Adenocarcinoma vs. Normal	Notterman Colon, Cancer Res, 2001
17. Rectal Adenoma vs. Normal	Sabates-Bellver Colon, Mol Cancer Res, 2007
18. Colorectal Adenocarcinoma vs. Normal	Skrzypczak Colorectal, PLoS One, 2010
19. Colorectal Carcinoma vs. Normal	Skrzypczak Colorectal, PLoS One, 2010
20. Colon Carcinoma vs. Normal	Skrzypczak Colorectal 2, PLoS One, 2010
21. Cecum Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal, No Associated Paper, 2011
22. Colon Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal, No Associated Paper, 2011
23. Colon Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal, No Associated Paper, 2011
24. Rectal Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal, No Associated Paper, 2011
25. Rectal Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal, No Associated Paper, 2011
26. Rectosigmoid Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal, No Associated Paper, 2011
27. Cecum Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal 2, No Associated Paper, 2011
28. Colon Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal 2, No Associated Paper, 2011
29. Colon Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal 2, No Associated Paper, 2011
30. Rectal Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal 2, No Associated Paper, 2011
31. Rectal Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal 2, No Associated Paper, 2011
32. Rectosigmoid Adenocarcinoma vs. Normal	TCGA Colorectal 2, No Associated Paper, 2011
33. Colon Carcinoma vs. Normal	Zou Colon, Oncogene, 2002

Figura 37. Expressão de LMWPTP em CRC. Foi feita a busca e análise de dados de transcriptoma em Oncomine™ a partir da busca por gene *ACP1* em (A-B) Oncomine™ com os números correspondentes de cada estudo na sub-tabela Oncomine (A) e GEOdataset (B-D) são apresentados. (E) O número de amostras analisadas para CRC foi: normal (n=11) e carcinoma (n=11), e a figura mostra lâminas representativas (aumento 20X). A intensidade e proporção foram classificadas de acordo com descrito por Allred et al, 1998 e estatística apresentada em (F). Os números embaixo dos quadrados de (A) representam as referências que estão descritas na tabela abaixo em (G).

4.3.1. Contribuição do estudo no contexto da literatura

Um dos fatores associado ao mau prognóstico é o desenvolvimento de metástase, evento frequente nesses pacientes, com acometimento em 50% dos casos de câncer de estômago e 20% em casos CRC, com severa redução do tempo de sobrevida (Mikami et al, 2017; Zhou et al, 2017). A identificação de potenciais alvos terapêuticos emerge como estratégia racional para aumentar bom prognóstico e taxa de sobrevida. Nas últimas décadas, grandes esforços foram feitos para compreender mecanismos moleculares dessa doença, o conhecimento no campo de quinases é extenso, enquanto no campo de fosfatases, principalmente sinalização, é pouco compreendido (Ferreira-Halder et al, 2019). Essas enzimas são geralmente associadas à habilidade de supressor tumoral, como é o caso da fosfatase PTEN. Entretanto, a desfosforilação de lipídios e proteínas pode culminar na ativação de vias de sinalização promotoras de perfil tumoral (Brooks et al, 2010; Fuhler et al, 2012). Nesse sentido, a LMWPTP, em particular, está mais expressa em tecidos de CRC, e tem relação com migração e agressividade tumoral (Hoekstra et al, 2015). De fato, a investigação de dados de transcriptoma (disponíveis em repositórios públicos) e validados em pesquisa histológica em biópsia de pacientes, confirmam maior expressão de LMWPTP em câncer de esôfago, estômago e CRC, reforçando a nossa hipótese dessa enzima ser biomarcador tumoral.

A partir dos nossos estudos de transdução de sinais e o desbalanço de expressão e/ou atividade de LMWPTP, nós mostramos que LMWPTP promove plasticidade celular para sustentar sinalização proliferativa, resistência a morte celular, desregulação metabólica e também ativação de invasão e metástase. Sendo assim, nesta tese, mostramos aumento da expressão de LMWPTP associada a cânceres do trato gastrointestinal, destacando a grande contribuição dessa fosfatase no desenvolvimento dessa doença.

5. Conclusões (resumo na Figura 38):

3-Bromopiruvato atua como disruptor da resposta das plaquetas derivadas de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer gastrointestinais e da interação plaquetas-células tumorais;

- A ativação da agregação por colágeno é dependente da via de sinalização mediada por Src quinase e requer a participação da LMWPTP;
- 3-Bromopiruvato reduziu a ativação plaquetária seletivamente (em resposta ao colágeno), e essa ação não é em decorrência de indução de apoptose (morte) das plaquetas, mas sim, em função da inibição da Src e proteínas tirosina fosfatases, em especial da LMWPTP, ou seja, não é um efeito aleatório, mas orquestrado no contexto de vias de sinalização;
- Plaquetas são ativadas pelo contato direto células CRC-plaquetas;
- 3-Bromopiruvato compromete a interação célula tumoral-plaqueta.
- Alto nível de proteínas tirosina fosfatases, em plaquetas de pacientes, indica que essa enzima pode ter um papel na “educação” plaquetária por tumor;
- 3-Bromopiruvato tem potencial para ser utilizado na prevenção do tromboembolismo e metástase em pacientes oncológicos.

Plaquetas alteram em dois parâmetros da biologia de células de câncer de colorretal: migração e nível da LMWPTP;

- Plaquetas promovem aumento da LMWPTP nas células HCT116, com consequente aumento da migração celular;
- A presença de plaquetas em co-cultura com a linhagem HCT116 promove aumento da expressão de LMWPTP, e consequentemente, a migração celular em 2D (formação de ferida) e em 3D (formação de esferoide). Anteriormente, foi descrito que a expressão de LMWPTP está diretamente relacionada à capacidade de migração de células HCT116 (Hoekstra et al, 2015), entretanto, a participação de plaquetas como promotor de expressão de LMWPTP e de migração celular é apresentado de forma inédita nesta tese;
- No caso das células HT29, a co-cultura com plaquetas não afetou o nível da LMWPTP, nem a proliferação dessas células; entretanto, foi observado maior número de colônias na presença de plaquetas. De forma interessante, células HT29 silenciadas para LMWPTP apresentaram colônias menores, em área, na presença de plaquetas, quando comparado à HT29 *wild type*;

LMWPTP: assinatura biológica em tumores gastrointestinais

- LMWPTP está em maiores níveis (RNA e proteína) em cânceres de esôfago, estômago e CRC, em comparação ao tecido normal;
- LMWPTP tem papel relevante no desenvolvimento tumoral;
- LMWPTP tem potencial aplicação como biomarcador.

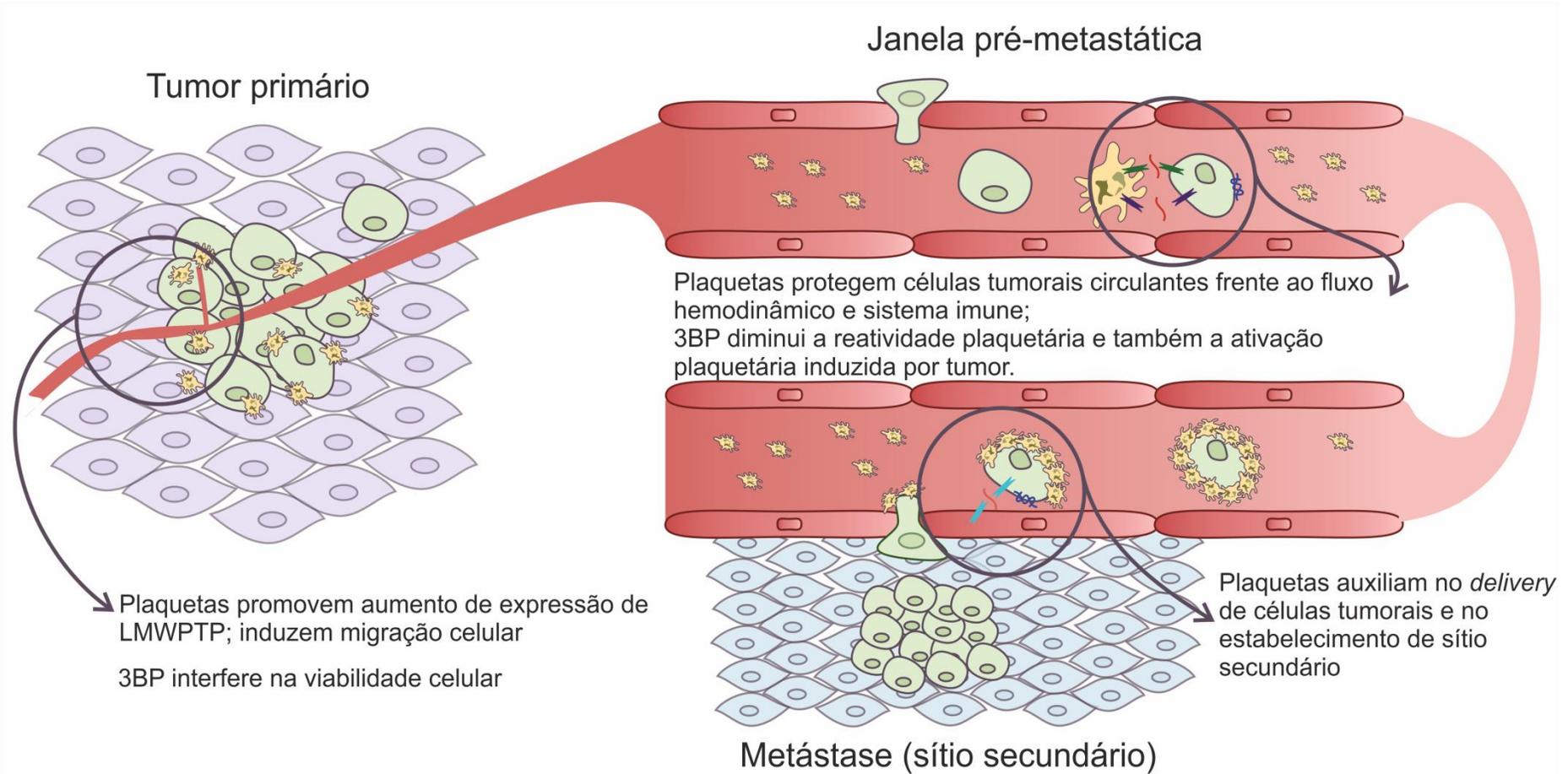


Figura 38. Resumo da contribuição de plaquetas em diferentes etapas da progressão tumoral e influência do 3-bromopiruvato (3BP) em cada etapa da metástase: desde a preparação do microambiente tumoral até a colonização metastática.

Referências

- Adachi I, Takahashi M, Adachi H, Horikoshi I. (1986). EL-4 tumor cell-induced human and rabbit platelet aggregations. *Cell Struct Funct.* 11(2):157-163.
- Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2(9):e71.
- Alberio L, Ravanat C, Hechler B, Mangin PH, Lanza F, Gachet C. (2017). Delayed-onset of procoagulant signalling revealed by kinetic analysis of COAT platelet formation. *Thromb Haemost.* 117(6):1101-1114.
- Alhopuro P, Sammalkorpi H, Niittymäki I, Biström M, Raitila A, Saharinen J, Nousiainen K, Lehtonen HJ, Heliövaara E, Puhakka J, Tuupanen S, Sousa S, Seruca R, Ferreira AM, Hofstra RM, Mecklin JP, Järvinen H, Ristimäki A, Orntoft TF, Hautaniemi S, Arango D, Karhu A, Aaltonen LA. (2012). Candidate driver genes in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Int J Cancer.* 130(7):1558-66. doi: 10.1002/ijc.26167.
- Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 11:155–168.
- Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ. (1999). Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(12):6745-50. doi: 10.1073/pnas.96.12.6745.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 117(6):699-711.
- Alsop BR, Sharma P. (2016). Esophageal Cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 45(3):399-412.
- Alves MM, Fuhler GM, Queiroz KC, Scholma J, Goorden S, Anink J, Spek CA, Hoogeveen-Westerveld M, Bruno MJ, Nellist M, Elgersma Y, Aronica E, Peppelenbosch MP. (2015). PAK2 is an effector of TSC1/2 signaling independent of mTOR and a potential therapeutic target for Tuberous Sclerosis Complex. *Sci Rep.* 28(5):14534.
- Andrade SS, Gouvea IE, Silva MC, Castro ED, de Paula CA, Okamoto D, Oliveira L, Peres GB, Ottaiano T, Facina G. (2016). Cathepsin K induces platelet dysfunction and affects cell signaling in breast cancer - molecularly distinct behavior of cathepsin K in breast cancer. *BMC Cancer.* 16(1):173.
- Andrade SS, Sousa Faria AV, Paulo Queluz D, Ferreira-Halder CV. (2019). Platelets as a "natural factory" for growth factor production that sustains normal (and pathological) cell biology. *Biol Chem.* 2019;pii: /j/bchm.just-accepted/hsz-2019-0342/hsz-2019-0342.xml. doi: 10.1515/hsz-2019-0342.
- Andrade SS, Sumikawa JT, Castro ED, Batista FP, Paredes-Gamero E, Oliveira LC, Guerra IM, Peres GB, Cavalheiro RP, Juliano L, Nazário AP, Facina G, Tsai SM, Oliva ML, Girão MJ. (2017). Interface between breast cancer cells and the tumor microenvironment using platelet-rich plasma to promote tumor angiogenesis - influence of platelets and fibrin bundles on the behavior of breast tumor cells. *Oncotarget.* 8(10):16851-16874.
- Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CV. (2003). Proteínas Tirosoina Fosfatases Propriedades e Funcoes Biologicas. *Quim. Nova.* 26(6):896-900.
- Arias-Salgado EG, Haj F, Dubois C, Moran B, Kasirer-Friede A, Furie BC, Furie B, Neel BG, Shattil SJ. (2005). PTP-1B is an essential positive regulator of platelet integrin signaling. *J Cell Biol.* 170(5):837-45.

- Aronson D, Brenner B. (2018). Arterial thrombosis and cancer. *Thromb Res.* 164(Suppl1):S23-S28.
- Aslan JE, Tormoen GW, Loren CP, Pang J, McCarty OJ. (2011). S6K1 and mTOR regulate Rac1-driven platelet activation and aggregation. *Blood.* 118(11):3129-3136.
- Azevedo-Silva J, Queirós O, Baltazar F, Ułaszewski S, Goffeau A, Ko YH, Pedersen PL, Preto A, Casal M. (2016). The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside. *J Bioenerg Biomembr.* 48(4):349-362.
- Azevedo-Silva J, Queirós O, Ribeiro A, Baltazar F, Young KH, Pedersen PL, Preto A, Casal M. (2015). The cytotoxicity of 3-bromopyruvate in breast cancer cells depends on extracellular pH. *Biochem J.* 467(2):247-258.
- Balmaña M, Mereiter S, Diniz F, Feijão T, Barrias CC, Reis CA. (2018). Multicellular Human Gastric-Cancer Spheroids Mimic the Glycosylation Phenotype of Gastric Carcinomas. *Molecules.* 23(11):2815. doi:10.3390/molecules23112815.
- Bambace NM, Holmes CE. (2011). The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost.* 9(2):237-249.
- Basu A, Gosain R, Tantry U, Miller K, Gurbel PA. (2015). Platelet Activation and Aggregation in Patients with Advanced Adenocarcinoma Undergoing Chemotherapy: Correlation with a Validated Venous Thromboembolism Risk Score. *Blood.* 126(23):3445.
- Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, Schellen P, Verschueren H, Post E, Koster J, Ylstra B, Ameziane N, Dorsman J, Smit EF, Verheul HM, Noske DP, Reijneveld JC, Nilsson RJA, Tannous BA, Wesseling P, Wurdinger T. (2015). RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell.* 28(5):666-676.
- Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. (2008). Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med.* 14(10):429-440.
- Born GV, Cross MJ. (1963). The aggregation of blood platelets. *J Physiol.* 168(1):178-195.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de diagnóstico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- Brattain MG, Brattain DE, Fine WD, Khaled FM, Marks ME, Kimball PM, Arcolano LA, Danbury BH. (1981). Initiation and characterization of cultures of human colonic carcinoma with different biological characteristics utilizing feeder layers of confluent fibroblasts. *Oncodev Biol Med.* 2(5):355-66.
- Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 41(5):1751-6.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68(6):394-424.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP. (2014). Colorectal cancer. *Lancet.* 383(9927):1490–1502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9
- Brooks R, Fuhler GM, Iyer S, Smith MJ, Park MY, Paraiso KH, Engelman RW, Kerr WG. (2010). SHIP1 inhibition increases immunoregulatory capacity and triggers apoptosis of hematopoietic cancer cells. *J Immunol.* 184(7):3582-9. doi:10.4049/jimmunol.0902844.

- Brunelle JK, Ryan J, Yecies D, Opferman JT, Letai A. (2009). MCL-1-dependent leukemia cells are more sensitive to chemotherapy than BCL-2-dependent counterparts. *J Cell Biol.* 187(3):429-442.
- Canault M, Duerschmied D, Brill A, Stefanini L, Schatzberg D, Cifuni SM, Bergmeier W, Wagner DD. (2010). p38 mitogen-activated protein kinase activation during platelet storage: consequences for platelet recovery and hemostatic function in vivo. *Blood.* 115(9):1835-1842.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C, Stuart JM. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet.* 45(10):1113-20. doi: 10.1038/ng.2764.
- Carr BI, Cavallini A, D'Alessandro R, Refolo MG, Lippolis C, Mazzocca A, Messa C. (2014). Platelet extracts induce growth, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma in vitro. *BMC Cancer.* 14:43. doi: 10.1186/1471-2407-14-43.
- Caselli A, Paoli P, Santi A, Mugnaioni C, Toti A, Camici G, Cirri P. (2016). Low molecular weight protein tyrosine phosphatase: Multifaceted functions of an evolutionarily conserved enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1864(10):1339-1355.
- Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. (2004). Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol.* 272(1):13-28.
- Chaffer CL, Weinberg RA. (2015). How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov.* 5(1):22-24.
- Chen CH, Lo RW, Urban D, Pluthero FG, Kahr WH. (2017 a). α -granule biogenesis: from disease to discovery. *Platelets.* 28(2):147-154.
- Chen Q, Li Y, Li Z, Zhao Q, Fan L. (2014). Overexpression of PTP1B in human colorectal cancer and its association with tumor progression and prognosis. *J Mol Histol.* 45(2):153-9.
- Chen TC, Yu J, Nouri Nigjeh E, Wang W, Myint PT, Zandi E, Hofman FM, Schönthal AH. (2017). A perillyl alcohol-conjugated analog of 3-bromopyruvate without cellular uptake dependency on monocarboxylate transporter 1 and with activity in 3-BP-resistant tumor cells. *Cancer Lett.* 400:161-174. doi: 10.1016/j.canlet.2017.04.015.
- Chen X, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Ji J, Li R, Chan AS, Law S, Troyanskaya OG, Wong J, So S, Botstein D, Brown PO. (2003). Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol Biol Cell.* 14(8):3208-15. doi: 10.1091/mbc.e02-12-0833.
- Chen Y, Tsang YS, Chou X, Hu J, Xia Q. (2019). A lung cancer patient with deep vein thrombosis: a case report and literature review. *BMC Cancer.* 19(1):285.
- Chiarugi P, Taddei ML, Schiavone N, Papucci L, Giannoni E, Fiaschi T, Capaccioli S, Raugei G, Ramponi G. (2004). LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth. *Oncogene.* 23(22):3905–3914.
- Cho JY, Lim JY, Cheong JH, Park YY, Yoon SL, Kim SM, Kim SB, Kim H, Hong SW, Park YN, Noh SH, Park ES, Chu IS, Hong WK, Ajani JA, Lee JS. (2011). Gene expression signature-based prognostic risk score in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 17(7):1850-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2180.
- Chong D, Ma L, Liu F, Zhang Z, Zhao S, Huo Q, Zhang P, Zheng H, Liu H. (2017). Synergistic antitumor effect of 3-bromopyruvate and 5-fluorouracil against human colorectal cancer through cell cycle arrest and induction of apoptosis. *Anticancer Drugs.* 28(8):831-840. doi: 10.1097/CAD.0000000000000517.
- Cooke NM, Egan K, McFadden S, Grogan L, Breathnach OS, O'Leary J, Hennessy

- BT, Kenny D. (2013). Increased platelet reactivity in patients with late-stage metastatic cancer. *Cancer Med.* 2(4):564-570.
- Coupland LA, Parish CR. (2014). Platelets, selectins, and the control of tumor metastasis. *Semin Oncol.* 41(18):422-434.
- Cui J, Chen Y, Chou WC, Sun L, Chen L, Suo J, Ni Z, Zhang M, Kong X, Hoffman LL, Kang J, Su Y, Olman V, Johnson D, Tench DW, Amster IJ, Orlando R, Puett D, Li F, Xu Y. (2011). An integrated transcriptomic and computational analysis for biomarker identification in gastric cancer. *Nucleic Acids Res.* 39(4):1197-207. doi: 10.1093/nar/gkq960.
- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 294(5547):1708-1712. doi:10.1126/science.1064829
- Cutcutache I, Wu AY, Suzuki Y, McPherson JR, Lei Z, Deng N, Zhang S, Wong WK, Soo KC, Chan WH, Ooi LL, Welsch R, Tan P, Rozen SG. (2016). Abundant copy-number loss of CYCLOPS and STOP genes in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer.* 19(2):453-465. doi: 10.1007/s10120-015-0514-z.
- Davison K, Mann KK, Waxman S, Miller WH Jr. (2004). JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood.* 103(9):3496-502.
- Deng N, Goh LK, Wang H, Das K, Tao J, Tan IB, Zhang S, Lee M, Wu J, Lim KH, Lei Z, Goh G, Lim QY, Tan AL, Sin Poh DY, Riahi S, Bell S, Shi MM, Linnartz R, Zhu F, Yeoh KG, Toh HC, Yong WP, Cheong HC, Rha SY, Boussioutas A, Grabsch H, Rozen S, Tan P. (2012). A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut.* 61(5):673-84. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301839.
- D'Errico M, de Rinaldis E, Blasi MF, Viti V, Falchetti M, Calcagnile A, Sera F, Saieva C, Ottini L, Palli D, Palombo F, Giuliani A, Dogliotti E. (2009). Genome-wide expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability. *Eur J Cancer.* 45(3):461-9. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.032.
- Edmead CE, Crosby DA, Southcott M, Poole AW. (1999). Thrombin-induced association of SHP-2 with multiple tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets. *FEBS Lett.* 459(1):27-32.
- Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegooijen M, Goede SL, Ries LA. (2010). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer.* 116(3):544-573.
- Eshleman JR, Lang EZ, Bowerfind GK, Parsons R, Vogelstein B, Willson JK, Veigl ML, Sedwick WD, Markowitz SD. (1995). Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene.* 10(1):33-7.
- Estevez B, Du X. (2017). New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda).* 32(2):162-177.
- Faria AVS, Andrade SS, Reijm AN, Spaander MCW, de Maat MPM, Peppelenbosch MP, Ferreira-Halder CV, Fuhler GM. (2019). Targeting Tyrosine Phosphatases by 3-Bromopyruvate Overcomes Hyperactivation of Platelets from Gastrointestinal Cancer Patients. *J Clin Med.* 8(7):936.
- Faria AVS, Clerici SP, de Souza Oliveira PF, Queiroz KCS, Peppelenbosch MP, Ferreira-Halder CV. (2020). LMWPTP modulates the antioxidant response and autophagy process in human chronic myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biochem.* 466(1-2):83-89. doi:10.1007/s11010-020-03690-1.

- Faria AVS, Tornatore TF, Milani R, Queiroz KC, Sampaio IH, Fonseca EM, Rocha-Brito KJ, Santos TO, Silveira LR, Peppelenbosch MP, Ferreira-Halder CV. (2017). Oncophosphosignaling Favors a Glycolytic Phenotype in Human Drug Resistant Leukemia. *J Cell Biochem.* 118(11):3846-3854
- Farndale RW. (2006). Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells Mol Dis.* 36(2):162-165.
- Ferreira CV, Queiroz KCS, Silva MAS, Peppelenbosch MP (2006). Patente Brasileira PIBr 0604691-6: Pharmaceutical formulation content protein phosphatase inhibitors for reverting cancer cell resistance.
- Ferreira PA, Ruela-de-Sousa RR, Queiroz KC, Souza AC, Milani R, Pilli RA, Peppelenbosch MP, den Hertog J, Ferreira CV. (2012). Knocking down low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) reverts chemoresistance through inactivation of Src and Bcr-Abl proteins. *PLoS One.* 7(9):e44312.
- Ferreira-Halder CV, Clerici SP, Faria AVS, Oliveira PFS, Cordeiro HG, Akagi E. (2019). Protein Tyrosine Phosphatases in Tumor Progression and Metastasis: Promotor or Protection?. *Tumor Progression and Metastasis.* IntechOpen.
- Fidler IJ. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3(6):453-458.
- Fogh J, Wright WC, Loveless JD. (1977). Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors. *JNCI.* 58(2):209-214.
- Fuhler GM, Brooks R, Toms B, Iyer S, Gengo EA, Park MY, Gumbleton M, Viernes DR, Chisholm JD, Kerr WG. (2012) Therapeutic potential of SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1 (SHIP1) and SHIP2 inhibition in cancer. *Mol Med.* 18:65-75. doi: 10.2119/molmed.2011.00178.
- Gaedcke J, Grade M, Jung K, Camps J, Jo P, Emons G, Gehoff A, Sax U, Schirmer M, Becker H, Beissbarth T, Ried T, Ghadimi BM. (2010). Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 49(11):1024-34. doi: 10.1002/gcc.20811.
- Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, Diaz LA Jr. (2019). Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 16(6):361-375.
- Garraud O, Cognasse F. (2015). Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells? *Front Immunol.* 20(6):70.
- Gaspar C, Cardoso J, Franken P, Molenaar L, Morreau H, Möslein G, Sampson J, Boer JM, de Menezes RX, Fodde R. (2008). Cross-species comparison of human and mouse intestinal polyps reveals conserved mechanisms in adenomatous polyposis coli (APC)-driven tumorigenesis. *Am J Pathol.* 172(5):1363-80. doi: 10.2353/ajpath.2008.070851.
- Gil-Bernabé AM, Lucotti S, Muschel RJ. (2013). Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *Br J Haematol.* 162(4):433-441.
- Gloria-Bottini F, Spina C, Nicotra M, Saccucci P, Ambrosi S, Bottini E. (2012). Acid phosphatase locus 1 genetic polymorphism and cancer grading. *Am J Med Sci.* 344(1):32-34.
- Graudens E, Boulanger V, Mollard C, Mariage-Samson R, Barlet X, Grémy G, Couillault C, Lajémi M, Piatier-Tonneau D, Zaborski P, Eveno E, Auffray C, Imbeaud S. (2006). Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biol.* 7(3):R19. doi: 10.1186/gb-2006-7-3-r19.
- Griffin C, Karnik A, McNulty J, Pandey S. (2011). Pancreatistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Mol.*

Cancer Ther. 10(1):57-68.

Gu R, Sun X, Chi Y, Zhou Q, Xiang H, Bosco DB, Lai X, Qin C, So KF, Ren Y, Chen XM. (2017). Integrin β 3/Akt signaling contributes to platelet-induced hemangioendothelioma growth. *Sci Rep.* 7(1):6455.

Guidetti GF, Torti M, Canobbio I. (2019). Focal Adhesion Kinases in Platelet Function and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 39(5):857–868. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311787.

Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. (2018). The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell.* 33(6):965-983.

Hao Y, Triadafilopoulos G, Sahbaie P, Young HS, Omary MB, Lowe AW. (2006). Gene expression profiling reveals stromal genes expressed in common between Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Gastroenterology,* 131(3), 925–933. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.026>

Henshall TL, Jones KL, Wilkinson R, Jackson DE. (2001). Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2, are required for platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD31-mediated inhibitory signaling. *J Immunol.* 166(5):3098-3106.

Hilmarsdottir B, Briem E, Halldorsson S, Krickler J, Ingthorsson S, Gustafsdottir S, Mælandsmo GM, Magnusson MK, Gudjonsson T.(2017). Inhibition of PTP1B disrupts cell-cell adhesion and induces anoikis in breast epithelial cells. *Cell Death Dis.* 11;8(5):e2769.

Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. (2002). Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res.* 62(1):233-40.

Hoekstra E, Das AM, Swets M, Cao W, van der Woude CJ, Bruno MJ, Peppelenbosch MP, Kuppen PJ, Ten Hagen TL, Fuhler GM. (2016). Increased PTP1B expression and phosphatase activity in colorectal cancer results in a more invasive phenotype and worse patient outcome. *Oncotarget.* 7(16):21922-21938.

Hoekstra E, Kodach LL, Das AM, Ruela-de-Sousa RR, Ferreira CV, Hardwick JC, van der Woude CJ, Peppelenbosch MP, Ten Hagen TL, Fuhler GM. (2015). Low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMWPTP) upregulation mediates malignant potential in colorectal cancer. *Oncotarget.* 6(10); 8300-12.

Hong Y, Downey T, Eu KW, Koh PK, Cheah PY. (2010). A 'metastasis-prone' signature for early-stage mismatch-repair proficient sporadic colorectal cancer patients and its implications for possible therapeutics. *Clin Exp Metastasis.* 27(2):83-90. doi: 10.1007/s10585-010-9305-4.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013.

Hsia CW, Wu MP, Velusamy M, Hsia CH, Chou DS, Tsai CL, Hsu CY, Jayakumar T, Chung CL, Sheu JR. (2018). Novel Therapeutic Agent against Platelet Activation In Vitro and Arterial Thrombosis In Vivo by Morin Hydrate. *Int J Mol Sci.* 19(8):pii: E2386.

Hu N, Clifford RJ, Yang HH, Wang C, Goldstein AM, Ding T, Taylor PR, Lee MP. (2010). Genome wide analysis of DNA copy number neutral loss of heterozygosity (CNNLOH) and its relation to gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC genomics,* 11, 576. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-576>

- Imai K, Yamamoto H. (2008). Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*. 29(4):673-680.
- Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. (2017). Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 108(3):283–289. doi:10.1111/cas.13155.
- Jailkhani N, Chaudhri VK, Rao KV. (2011). Regulatory cascades of protein phosphatases: implications for cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem*. 11(1):64-77.
- Jankowski J, Henning L, Schlüter H. (2004). Analysis of the releasable nucleotides of platelets. *Methods Mol Biol*. 272(1):97-108.
- Jardim-Messeder D, Moreira-Pacheco F. (2016). 3-Bromopyruvic Acid Inhibits Tricarboxylic Acid Cycle and Glutaminolysis in HepG2 Cells. *Anticancer Res*. 36(5):2233-2241.
- Jia H, Janjanam J, Wu SC, Wang R, Pano G, Celestine M, Martinot O, Breeze-Jones H, Clayton G, Garcin C, Shirinifard A, Zaske AM, Finkelstein D, Labelle M. (2019). The tumor cell-secreted matricellular protein WISP1 drives pro-metastatic collagen linearization. *EMBO J*. 38(16):e101302. doi: 10.15252/embj.2018101302.
- Jiang L, Luan Y, Miao X, Sun C, Li, Huang Z, Xu D, Zhang M, Kong F, Li N. (2017). Platelet releasate promotes breast cancer growth and angiogenesis via VEGF-integrin cooperative signalling. *Br J Cancer*. 117(5):695-703.
- Kaiser S, Park YK, Franklin JL, Halberg RB, Yu M, Jessen WJ, Freudenberg J, Chen X, Haigis K, Jegga AG, Kong S, Sakthivel B, Xu H, Reichling T, Azhar M, Boivin GP, Roberts RB, Bissahoyo AC, Gonzales F, Bloom GC, Eschrich S, Carter SL, Aronow JE, Kleimeyer J, Kleimeyer M, Ramaswamy V, Settle SH, Boone B, Levy S, Graff JM, Doetschman T, Groden J, Dove WF, Threadgill DW, Yeatman TJ, Coffey RJ Jr, Aronow BJ. (2007). Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome Biol*. 8(7):R131. doi: 10.1186/gb-2007-8-7-r131.
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. Version 2. *Mol Oncol*. 1(1):84-96. doi: 10.1016/j.molonc.2007.02.004.
- Khorana AA, Carrier M, Garcia DA, Lee AY. (2016). Guidance for the prevention and treatment of cancer-associated venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis*. 41(1):81-91.
- Khorana AA. (2003). Malignancy, thrombosis and Trousseau: the case for an eponym. *J Thromb Haemost*. 1(12):2463–2465. doi:10.1111/j.1538-7836.2003.00501.x
- Kikawa KD, Vidale DR, Van Etten RL, Kinch MS. (2002). Regulation of the EphA2 Kinase by the Low Molecular Weight Tyrosine Phosphatase Induces Transformation. *J. Biol. Chem*. 277(42):39274–39279.
- Kimchi ET, Posner MC, Park JO, Darga TE, Kocherginsky M, Karrison T, Hart J, Smith KD, Mezhir JJ, Weichselbaum RR, Khodarev NN. (2005). Progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma is associated with the suppression of the transcriptional programs of epidermal differentiation. *Cancer research*, 65(8), 3146–3154. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2490>
- Ko YH, Verhoeven HA, Lee MJ, Corbin DJ, Vogl TJ, Pedersen PL. (2012). A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside. *J.*

Bioenerg. Biomembr. 44(1):163-170.

Kobayashi G, Sentani K, Hattori T, Yamamoto Y, Imai T, Sakamoto N, Kuraoka K, Oue N, Sasaki N, Taniyama K, Yasui W. (2019). Clinicopathological significance of caspase overexpression and its association with spheroid formation in gastric cancer. *Hum Pathol.* 84:8-17. doi: 10.1016/j.humpath.2018.09.001.

Koizume S, Miyagi Y. (2014). Breast cancer phenotypes regulated by tissue factor-factor VII pathway: Possible therapeutic targets. *World J Clin Oncol.* 10(5):908-920.

Kornblith LZ, Robles AJ, Conroy AS, Hendrickson CM, Calfee CS, Fields AT, Callcut RA, Cohen MJ. (2018). Perhaps it's not the platelet: Ristocetin uncovers the potential role of von Willebrand factor in impaired platelet aggregation following traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 85(5):873-880.

Koupenova M, Corkrey HA, Vitseva O, Manni G, Pang CJ, Clancy L, Yao C, Rade J, Levy D, Wang JP, Finberg RW, Kurt-Jones EA, Freedman JE. (2019). The role of platelets in mediating a response to human influenza infection. *Nat Commun.* 10(1):1780. doi: 10.1038/s41467-019-09607-x.

Kuchay SM, Kim N, Grunz EA, Fay WP, Chishti AH. (2007). Double knockouts reveal that protein tyrosine phosphatase 1B is a physiological target of calpain-1 in platelets. *Mol Cell Biol.* 27(17):6038-6052.

Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, Miyakura Y, Hamada T, Haruta H, Hatanaka H, Soda M, Choi YL, Takada S, Yasuda Y, Nagai H, Mano H. (2008). Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 99(9):1835-40. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00881.x.

Labelle M, Begum S, Hynes RO. (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell.* 20(5):576-90.

Labelle M, Begum S, Hynes RO. (2014). Platelets guide the formation of early metastatic niches. *PNAS.* 14(30):E3053-E3061.

Lavergne M, Janus-Bell E, Schaff M, Gachet C, Mangin PH. (2017). Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target? *Cancers (Basel).* 9(10):pii:E133.

Lee H, Yi JS, Lawan A, Min K, Bennett AM. (2015). Mining the function of protein tyrosine phosphatases in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 37(1):66-72.

Lee SH, Du J, Stitham J, Atteya G, Lee S, Xiang Y, Wang D, Jin Y, Leslie KL, Spollett G, Srivastava A, Mannam P, Ostriker A, Martin KA, Tang WH, Hwa J. (2016). Inducing mitophagy in diabetic platelets protects against severe oxidative stress. *EMBO Mol Med.* 8(7):779-95.

Lessard L, Stuiblé M, Tremblay ML. (2010). The two faces of PTP1B in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1804(3):613-9.

Lippi G, Plebani M, Michael Henry B. (2020). Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* S0009-8981(20)30124-8. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.022.

Lis P, Dyląg M, Niedźwiecka K, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, Ułaszewski S. (2016). The HK2 Dependent "Warburg Effect" and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate. *Molecules.* 21(12):pii:E1730

Lisman T, Weeterings C, de Groot PG. (2005). Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen). *Front Biosci.* 10(1):2504-2517.

Litvinov RI, Farrell DH, Weisel JW, Bennett JS. (2016). The Platelet Integrin α IIb β 3 Differentially Interacts with Fibrin Versus Fibrinogen. *J Biol Chem.* 291(15):7858-67.

- Liu H, Wu Y, Zhu S, Liang W, Wang Z, Wang Y, Lv T, Yao Y, Yuan D, Song Y. (2015). PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 359(2):218-25.
- Liu L, Chen M, Zhao L, Zhao Q, Hu R, Zhu J, Yan R, Dai K. (2017). Ethanol Induces Platelet Apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res.* 41(2):291-298.
- Liu Y, Bodmer WF. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(4):976-981.
- Locard-Paulet M, Lim L, Veluscek G, McMahon K, Sinclair J, van Weverwijk A, Worboys JD, Yuan Y, Isacke CM, Isacke CM, Jørgensen C. (2016). Phosphoproteomic analysis of interacting tumor and endothelial cells identifies regulatory mechanisms of transendothelial migration. *Sci Signal.* 9(414):ra15.
- Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer KL, Baldus SE, Huckenbeck W, Piekorz RP, Knoefel WT, Krieg A, Stoecklein NH. (2013). Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One.* 8(3):e59689. doi: 10.1371/journal.pone.0059689.
- Lyman GH, Culakova E, Poniewierski MS, Kuderer NM. (2018). Morbidity, mortality and costs associated with venous thromboembolism in hospitalized patients with cancer. *Thromb Res.* 164(Suppl1):S112-S118.
- Malentacchi F, Marzocchini R, Gelmini S, Orlando C, Serio M, Ramponi G, Raugei G. (2005). Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase Slow Isoform Knockdown in MDA-MB-435 Cells Decreases RAW 264.7 Osteoclastic Differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334(5):875-883.
- Mancini F, Rigacci S, Berti A, Balduini C, Torti M. (2007). The low-molecular-weight phosphotyrosine phosphatase is a negative regulator of FcγRIIA-mediated cell activation. *Blood.* 110(6):1871-8.
- Markowitz SD, Bertagnolli MM. (2009). Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 361(25):2449-2460.
- Marshall-Webb M, Bright T, Price T, Thompson SK, Watson DI. (2017). Venous thromboembolism in patients with esophageal or gastric cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Dis Esophagus.* 30(2):1-7.
- Medina C, Jurasz P, Santos-Martinez MJ, Jeong SS, Mitsky T, Chen R, Radomski MW. (2006). Platelet aggregation-induced by caco-2 cells: regulation by matrix metalloproteinase-2 and adenosine diphosphate. *J Pharmacol Exp Ther.* 317(2):739-745.
- Mikami J, Kimura Y, Makari Y, Fujita J, Kishimoto T, Sawada G, Nakahira S, Nakata K, Tsujie M, Ohzato H. (2017). Clinical outcomes and prognostic factors for gastric cancer patients with bone metastasis. *World J Surg Oncol.* 15(1):8.
- Mills EW, Green R, Ingolia NT. (2017). Slowed decay of mRNAs enhances platelet specific translation. *Blood.* 129(17):e38-e48.
- Mitrugno A, Sylman JL, Ngo AT, Pang J, Sears RC, Williams CD, McCarty OJ. (2017). Aspirin therapy reduces the ability of platelets to promote colon and pancreatic cancer cell proliferation: Implications for the oncoprotein c-MYC. *Am J Physiol Cell Physiol.* 312(2):C176-C189.
- Modesti A, Marzocchini R, Raugei G, Chiti F, Sereni A, Magherini F, Ramponi G. (1998). Cloning, expression and characterisation of a new human low Mr phosphotyrosine protein phosphatase originating by alternative splicing. *FEBS Lett.* 431(1):111-115.
- Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Díaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M. (2010). Differential colorectal

carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol.* 2(3):151-158.

Mori J, Wang YJ, Ellison S, Heising S, Neel BG, Tremblay ML, Watson SP, Senis YA. (2012). Dominant role of the protein-tyrosine phosphatase CD148 in regulating platelet activation relative to protein-tyrosine phosphatase-1B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(12):2956-65.

Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. (2001). The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci.* 936(1):11-30.

Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN, Love CG, Li S, Burgess AW, Arango D, Strausberg RL, Buchanan D, Wormald S, O'Connor L, Wilding JL, Bicknell D, Tomlinson IP, Bodmer WF, Mariadason JM, Sieber OM. (2014). Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Res.* 74(12):3238-3247.

Mustelin T, Vang T, Bottini N. (2005). Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol.* 5(1):43-57.

Musumeci L, Kuijpers MJ, Gilio K, Hego A, Théâtre E, Maurissen L, Vandereyken M, Diogo CV, Lecut C, Guilmain W, Bobkova EV, Eble JA, Dahl R, Drion P, Rascon J, Mostofi Y, Yuan H, Sergienko E, Chung TD, Thiry M, Senis Y, Moutschen M, Mustelin T, Lancellotti P, Heemskerk JW, Tautz L, Oury C, Rahmouni S. (2015). Dual-specificity phosphatase 3 deficiency or inhibition limits platelet activation and arterial thrombosis. *Circulation.* 131(7):656-668.

Nath S, Devi GR. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* 163:94-108. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013

Navi BB, Reiner AS, Kamel H, Iadecola C, Okin PM, Elkind MSV, Panageas KS, DeAngelis LM. (2017). Risk of Arterial Thromboembolism in Patients With Cancer. *J Am Coll Cardiol.* 70(8):926-938.

Nayak MK, Dhanesha N, Doddapattar P, Rodriguez O, Sonkar VK, Dayal S, Chauhan AK. (2018). Dichloroacetate, an inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinases, inhibits platelet aggregation and arterial thrombosis. *Blood Adv.* 2(15):2029-2038.

Nilsson H, Lindgren D, Mandahl Forsberg A, Mulder H, Axelson H, Johansson ME. (2015). Primary clear cell renal carcinoma cells display minimal mitochondrial respiratory capacity resulting in pronounced sensitivity to glycolytic inhibition by 3-Bromopyruvate. *Cell Death Dis.* 6(1):e1585.

Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. (2001). Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res.* 61(7):3124-30.

Nunes AS, Barros AS, Costa EC, Moreira AF, Correia IJ. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng.* 116(1):206-226. doi:10.1002/bit.26845

Nyga A, Cheema U, Loizidou M. (2011). 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J Cell Commun Signal.* 3:239–248. doi: 10.1007/s12079-011-0132-4

Oliveira I, Girão MJBC, Sampaio UM, Oliva MLV, Andrade SS. (2013). Plaquetas: Papéis tradicionais e não tradicionais na hemostasia, na inflamação e no câncer. *ABCS Health Sci.* 38(3):153-161.

Orellana R, Kato S, Erices R, Bravo ML, Gonzalez P, Oliva B, Cubillos S, Valdivia A, Ibañez C, Brañes J, Barriga MI, Bravo E, Alonso C, Bustamente E, Castellon E, Hidalgo P, Trigo C, Panes O, Pereira J, Mezzano D, Cuello MA, Owen GI. (2015). Platelets enhance tissue factor protein and metastasis initiating cell markers, and act

- as chemoattractants increasing the migration of ovarian cancer cells. *BMC Cancer*. 15:290. doi: 10.1186/s12885-015-1304-z.
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(10):839-845. doi:10.1038/nrm2236
- Park H, Jeong CW, Yuk H, Ku JH, Kim HH, Kwak C, Kim I. (2019). Influence of Tumor Thrombus on Occurrence of Distant Venous Thromboembolism and Survival in Patients With Renal Cell Carcinoma After Surgery. *Clin Appl Thromb Hemost*. 25(1):1076029618823288.
- Park Y, Kim SU, Park SY, Kim BK, Park JY, Kim DY, Ahn SH, Tak WY, Kweon YO, Han KH. (2015). A novel model to predict esophageal varices in patients with compensated cirrhosis using acoustic radiation force impulse elastography. *PloS one*, 10(3), e0121009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121009>
- Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 115(12):3348-3354.
- Pavlovic N, Rani B, Gerwins P, Heindryckx F. (2019). Platelets as Key Factors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 11(7):1022. doi:10.3390/cancers11071022.
- Pereira da Silva AP, El-Bacha T, Kyaw N, dos Santos RS, da-Silva WS, Almeida FC, Da Poian AT, Galina A. (2009). Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *Biochemical Journal*. 417(3):717-726.
- Perez AG, Rodrigues AA, Luzo AC, Lana JF, Belangero WD, Santana MH. (2014). Fibrin network architectures in pure platelet-rich plasma as characterized by fiber radius and correlated with clotting time. *J Mater Sci Mater Med*. 25(8):1967–1977. doi:10.1007/s10856-014-5235-z.
- Pichla M, Sroka J, Pienkowska N, Piwowarczyk K, Madeja Z, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. (2019). Metastatic prostate cancer cells are highly sensitive to 3-bromopyruvic acid. *Life Sci*. 227:212-223. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.066.
- Plantureux L, Mège D, Crescence L, Carminita E, Robert S, Cointe S, Brouilly N, Ezzedine W, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. (2020). The Interaction of Platelets with Colorectal Cancer Cells Inhibits Tumor Growth but Promotes Metastasis. *Cancer Res*. 80(2):291-303. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1181.
- Ponomareva AA, Nevzorova TA, Mordakhanova ER, Andrianova IA, Rauova L, Litvinov RI, Weisel JW. (2017). Intracellular origin and ultrastructure of platelet-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 15(8):1655-1667.
- Price TJ, Segelov E, Burge M, Haller DG, Ackland SP, Tebbutt NC, Karapetis CS, Pavlakakis N, Sobrero AF, Cunningham D, Shapiro JD. (2013). Current opinion on optimal treatment for colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 13(5):597-611.
- Pugh N, Maddox BD, Bihan D, Taylor KA, Mahaut-Smith MP, Farndale RW. (2017). Differential integrin activity mediated by platelet collagen receptor engagement under flow conditions. *Thromb Haemost*. 117(8):1588-1600.
- Ragab A, Bodin S, Viala C, Chap H, Payrastre B, Ragab-Thomas J. (2003). The tyrosine phosphatase 1B regulates linker for activation of T-cell phosphorylation and platelet aggregation upon FcγRIIIa cross-linking. *J Biol Chem*. 278(42):40923-32.
- Ravi S, Chacko B, Sawada H, Kramer PA, Johnson MS, Benavides GA, O'Donnell V, Marques MB, Darley-Usmar VM. (2015). Metabolic Plasticity in Resting and Thrombin Activated Platelets. *PLoS One*. 10(4):e0123597.
- Reinhart WH. Platelets in vascular disease. (2013). *Clin Hemorheol Microcirc*. 53(1-2):71-79.

- Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. (2004). ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 6(1):1-6. doi: 10.1016/s1476-5586(04)80047-2.
- Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S, Unterleuthner D, Unger C, Kramer N, Hengstschläger M, Kenner L, Pfeiffer D, Krupitza G, Dolznig H. (2017). Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci*. 2017;130(1):203-218. doi: 10.1242/jcs.188102.
- Roberts DE, McNicol A, Bose R. (2004). Mechanism of Collagen Activation in Human Platelets. *J Biol Chem*. 279(19):19421-19430.
- Robinson JR, Newcomb PA, Hardikar S, Cohen SA, Phipps AI. (2017). Stage IV colorectal cancer primary site and patterns of distant metastasis. *Cancer Epidemiol*. 48(1):92-95.
- Ruela-de-Sousa RR, Hoekstra E, Hoogland AM, Souza Queiroz KC, Peppelenbosch MP, Stubbs AP, Pelizzaro-Rocha K, van Leenders GJ, Jenster G, Aoyama H, Ferreira CV, Fuhler GM. (2016). Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase Predicts Prostate Cancer Outcome by Increasing the Metastatic Potential. *Eur Urol*. S0302-2838(15):00543-6.
- Rumbaut RE, Thiagarajan P. (2010). Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.
- Sabates-Bellver J, Van der Flier LG, de Palo M, Cattaneo E, Maake C, Rehrauer H, Laczko E, Kurowski MA, Bujnicki JM, Menigatti M, Luz J, Ranalli TV, Gomes V, Pastorelli A, Faggiani R, Anti M, Jiricny J, Clevers H, Marra G. (2007). Transcriptome profile of human colorectal adenomas. *Mol Cancer Res*. 5(12):1263-75. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0267.
- Sahara K, Paredes AZ, Merath K, Tsilimigras DI, Bagante F, Ratti F, Marques HP, Soubrane O, Beal EW, Lam V, Poultsides GA, Popescu I, Alexandrescu S, Martel G, Aklile W, Guglielmi A, Hugh T, Aldrighetti L, Endo I, Pawlik TM. (2020). Evaluation of the ACS NSQIP Surgical Risk Calculator in Elderly Patients Undergoing Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointest Surg*. 24(3):551–559. doi:10.1007/s11605-019-04174-4
- Senis YA, Mazharian A, Mori J. (2014). Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*. 124(13):2013-24. doi: 10.1182/blood-2014-01-453134.
- Senis YA. (2013). Protein-tyrosine phosphatases: a new frontier in platelet signal transduction. *J Thromb Haemost*. 11(10):1800–1813. doi:10.1111/jth.12359
- Shi M, Chen MS, Sekar K, Tan CK, Ooi LL, Hui KM. (2014). A blood-based three-gene signature for the non-invasive detection of early human hepatocellular carcinoma. *European journal of cancer*, 50(5),928–936. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.11.026>.
- Shin EK, Park H, Noh JY, Lim KM, Chung JH. (2017). Platelet Shape Changes and Cytoskeleton Dynamics as Novel Therapeutic Targets for Anti-Thrombotic Drugs. *Biomol Ther (Seoul)*. 25(3):223-230.
- Shiri R, Yari F, Ahmadinejad M, Vaeli S, Tabatabaei MR. (2014). The caspase-3 inhibitor (peptide Z-DEVD-FMK) affects the survival and function of platelets in platelet concentrate during storage. *Blood Res*. 49(1):49-53.
- Silva DAS, Tremblay MS, Souza MFM, Mooney M, Naghavi M, Malta DC. (2018). Mortality and years of life lost by colorectal cancer attributable to physical inactivity in Brazil (1990-2015): Findings from the Global Burden of Disease Study. *PLoS One*. 13(2):e0190943.

- Silver WP, Keller MP, Teel R, Silver D. (1993). Effects of donor characteristics and platelet in vitro time and temperature on platelet aggregometry. *J Vasc Surg.* 17(4):726-33.
- Skrzypczak M, Goryca K, Rubel T, Paziewska A, Mikula M, Jarosz D, Pachlewski J, Oledzki J, Ostrowski J. (2010). Modeling oncogenic signaling in colon tumors by multidirectional analyses of microarray data directed for maximization of analytical reliability. *PLoS One.*5(10):e13091. doi: 10.1371/journal.pone.0013091.
- Souza AC, Azoubel S, Queiroz KC, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. (2009). From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cell Mol Life Sci.* 66(7):1140-1153.
- Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, Bronk LF, Ananta JS, Mandelin J, Georgescu MM, Bankson JA, Gelovani JG, Killian TC, Arap W, Pasqualini R. (2010). Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol.* 5(4):291-6.
- Spek CA, Versteeg HH, Borensztajn KS. (2015). Anticoagulant therapy of cancer patients: Will patient selection increase overall survival? *Thromb Haemost.* 114(3):530-536.
- Su H, Hu N, Yang HH, Wang C, Takikita M, Wang QH, Giffen C, Clifford R, Hewitt SM, Shou JZ, Goldstein AM, Lee MP, Taylor PR. (2011). Global gene expression profiling and validation in esophageal squamous cell carcinoma and its association with clinical phenotypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(9), 2955–2966. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2724>
- Sun X, Sun G, Huang Y, Hao Y, Tang X, Zhang N, Zhao L, Zhong R, Peng Y. (2020). 3-Bromopyruvate regulates the status of glycolysis and BCNU sensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* 177:113988. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113988.
- Sun Y, Liu Z, Zou X, Lan Y, Sun X, Wang X, Zhao S, Jiang C, Liu H. (2015). Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer. *J Bioenerg Biomembr.* 47(4):319-29. doi: 10.1007/s10863-015-9612-1.
- Takahashi K, Ito H, Hashimoto M, Mita K, Asakawa H, Hayashi T, Fujino K2. (2017). Does antithrombotic therapy improve survival with colorectal cancer? *World J Surg Oncol.* 15(1):161.
- Takawa M, Masuda K, Kunizaki M, Daigo Y, Takagi K, Iwai Y, Cho HS, Toyokawa G, Yamane Y, Maejima K, Field HI, Kobayashi T, Akasu T, Sugiyama M, Tsuchiya E, Atomi Y, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R. (2011). Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker. *Cancer Sci.* 102(7):1298-1305.
- Tamura Y, Simizu S, Osada H. (2004). The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Lett.* 569(1-3):249-255.
- Tang M, Jiang L, Lin Y, Wu X, Wang K, He Q, Wang X, Li W. (2017). Platelet microparticle-mediated transfer of miR-939 to epithelial ovarian cancer cells promotes epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget.* 8(57):97464-97475.
- Tautz L, Senis YA, Oury C, Rahmouni S. (2015). Perspective: Tyrosine phosphatases as novel targets for antiplatelet therapy. *Bioorg Med Chem.* 23(12):2786-2797.
- Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. (2014). The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* 53(7):852–64.

- Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H, Devine MT, Fuchs TA, Weyrich AS, Semple JW, Flaumenhaft R, Italiano JE Jr. (2012). T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol.* 198(4):561-74. doi: 10.1083/jcb.201111136.
- Tison P, Kubisz P, Cernáček P, Dzúrik R. (1983). Influence of inhibitor of glucose utilization on the blood platelet function. *Nephron.* 33(4):253-256.
- Trousseau A. (1865). Phlegmasia alba dolens. *Clin Med Hotel-dieu Paris.* 3(1):654-712.
- van der Spuy WJ, Augustine TN. (2016). Ultrastructural investigation of the time-dependent relationship between breast cancer cells and thrombosis induction. *Micron.* 90:59-63. doi:10.1016/j.micron.2016.08.006.
- van Es N, Sturk A, Middeldorp S, Nieuwland R. (2014). Effects of cancer on platelets. *Semin Oncol.* 41(3):311-318.
- van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res.* 728(1-2):23-34.
- Vilahur G, Gutiérrez M, Arzanauskaite M, Mendieta G, Ben-Aicha S, Badimon L. (2018). Intracellular platelet signalling as a target for drug development. *Vascul Pharmacol.* 111(1):22-25.
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 51(10):2515-2520.
- Vuik FE, Nieuwenburg SA, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, Zadnik V, Pellisé M, Esteban L, Kaminski MF, Suchanek S, Ngo O, Májek O, Leja M, Kuipers EJ, Spaander MC. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut.* 68(10):1820-1826.
- Wadhwa R, Song S, Lee JS, Yao Y, Wei Q, Ajani JA. (2013). Gastric cancer-molecular and clinical dimensions. *Nat Rev Clin Oncol.* 10(11):643-55. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.170.
- Wang J, Liu B, Chen X, Su L, Wu P, Wu J, Zhu Z. (2012). PTP1B expression contributes to gastric cancer progression. *Med Oncol.* 29(2):948-56.
- Wang W, Cao Y, Zhou X, Wei B, Zhang Y, Liu X. (2018). PTP1B promotes the malignancy of ovarian cancer cells in a JNK-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 503(2):903-909.
- Ware MJ, Keshishian V, Law JJ, Ho JC, Favela CA, Rees P, Smith B, Mohammad S, Hwang RF, Rajapakshe K, Coarfa C, Huang S, Edwards DP, Corr SJ, Godin B, Curley SA. (2016). Generation of an in vitro 3D PDAC stroma rich spheroid model. *Biomaterials.* 108:129-42. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.041.
- Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, Osterland M, Golfier S, Räse S, Ansari N, Esner M, Bickle M, Pampaloni F, Mattheyer C, Stelzer EH, Parczyk K, Pechtl S, Steigemann P. (2014). 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res.* 323(1):131-43. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.01.017.
- Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. (2002). Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 1(4):273-288.
- Wong A, Ma BB. (2014). Personalizing therapy for colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 12(1):139-144.
- Xian SL, Cao W, Zhang XD, Lu YF. (2016). 3-Bromopyruvate inhibits human gastric cancer tumor growth in nude mice via the inhibition of glycolysis. *Oncol Lett.* 12(6):5377. doi: 10.3892/ol.2016.5370.

- Zacharski LR. (1982). The biologic basis for anticoagulant treatment of cancer. *Prog Clin Biol Res.* 89(1):113-129.
- Zambuzzi WF, Granjeiro JM, Parikh K, Yuvaraj S, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. (2008). Modulation of Src activity by low molecular weight protein tyrosine phosphatase during osteoblast differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 22(5-6):497-506.
- Zhao S, Sedwick D, Wang Z. (2015). Genetic alterations of protein tyrosine phosphatases in human cancers. *Oncogene.* 34(30):3885-3894.
- Zharikov S, Shiva S. (2013). Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochem Soc Trans.* 41(1):118-123.
- Zhou J, Ma X, Bi F, Liu M. (2017). Clinical significance of circulating tumor cells in gastric cancer patients. *Oncotarget.* 8(15):25713-25720.
- Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ. (2002). Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene.* 21(31):4855-62. doi: 10.1038/sj.onc.1205613.
- Zufferey A, Fontana P, Reny JL, Nolli S, Sanchez JC. (2012). Platelet proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 31(2):331-351.

Anexos

1. Comité de ética



Gastroenterology & Hepatology

Direct dial +31 10 7032792
 Fax number +31 10 7032793
 Internal postal address
 E-mail g.fuhler@erasmusmc.nl
 Our reference
 Date October 23rd, 2020

Concerning IRB approval Erasmus MC, Dr de Sousa Faria

Postal address
 P.O. box 2040
 3000 CA Rotterdam, NL

PROTOCOL TITLE

The cellular and molecular interaction between tumor cells and platelets – role in diagnosis and tumor metastasis

Visiting address
 Wytemaweg 80
 3015 CN Rotterdam, NL

Protocol ID	NL66029.078.18 v2
Short title	Tumor platelet interaction
Version	2.0
Date	05-09-2018
Coordinating investigator/project leader	G.M. Fuhler Email: g.fuhler@erasmusmc.nl Phone: 31(0)10 70 35821
Principal investigator(s) (in Dutch: hoofdonderzoeker/ uitvoerder)	V.M.C.W Spaander Email: v.spaander@erasmusmc.nl Phone: 31 (0) 10 703 5643 (Physicians/Clinicians) S.Y. Lam Email: s.lam@erasmusmc.nl (Physicians/Clinicians)
Sponsor (in Dutch: verrichter/opdrachtgever)	Erasmus University Medical Center 's Gravendijkwal 230, 3015CE Rotterdam
Subsiding party	Erasmus University Medical Center
Independent expert	A.V. (Alessandra Valeria) de Sousa Faria Email: a.desousafaria@erasmusmc.nl Email: alessandravsfaria@gmail.com
Laboratory sites	Erasmus University Medical Center Department of Gastroenterology and Hepatology Head of laboratory: Prof. Dr. M.P. Peppelenbosch Email: m.peppelenbosch@erasmusmc.nl Phone: 31(0)10 70 32792

Car Park
 Wytemaweg 12
 3015 CN Rotterdam

Prof. M.J.Bruno MD PhD
 Department Chair

Clinic
 H.R. van Buuren MD PhD
 D.L. Cahen MD PhD
 S. Coenen MD
 S. Darwish Murad MD PhD
 W. de Graaf MD PhD
 M.J.A.L. Grubben MD PhD
 L. Hol MD PhD
 P.J.F. de Jonge MD PhD
 R.J. de Kneegt MD PhD
 A.D. Koch MD PhD
 Prof. R.A. de Man MD PhD
 Prof. H.J. Metselaar MD PhD
 J.W. Poley MD PhD
 V.M.C.W. Spaander MD PhD
 D. Sprengers MD PhD
 P. Taimr MD
 A.C. de Vries MD PhD
 Prof. C.J. van der Woude MD PhD
 Laboratory
 Prof. M. Peppelenbosch PhD, head
 P.A. Boonstra PhD
 G.M. Fuhler PhD
 H.R. de Jonge PhD
 J. Kwekkeboom PhD
 M.J.M. Smits PhD
 T. Vanwolleghem MD PhD
 A.J. van Vuuren PhD
 A.M. Woltman PhD

Page 2/2

Our reference Error! No text of specified style in document.

Date October 23rd, 2020

PROTOCOL SIGNATURE SHEET

Name	Signature	Date
Head of Laboratory: Prof. Dr. M.P. Peppelenbosch m.peppelenbosch@erasmusmc.nl Phone: 31(0)10 70 32792		23/10/20
Coordinating investigator/project leader: Dr. G.M. Fuhler g.fuhler@erasmusmc.nl Phone: 31(0)10 70 35821		23-10-2020





Gastroenterology & Hepatology

Direct dial +31 10 7032792
 Fax number +31 10 7032793
 Internal postal address
 E-mail g.fuhler@erasmusmc.nl
 Our reference
 Date October 16th 2020

Concerning Ethical approval

To whom it may concern.

I would like to inform you of ethical committee project:

Number: MEC-2018-113 NL66029.078.18 v2

Title: *Tumor platelet interaction. The cellular and molecular interaction between tumor cells and platelets – role in diagnosis and tumor metastasis.*

Team:

Principal Investigator/Staff: Dr. Gwenny M. Fuhler
 Physicians/Clinicians: Dr. V.M.C.V. Spaander and S.Y. Lam
 PhD candidate/Researcher: Alessandra Valeria de Sousa Faria

An research paper was published referring the mentioned ethical committee number: Faria AVS, Andrade SS, Reijm AN, Spaander MCW, de Maat MPM, Peppelenbosch MP, Ferreira-Halder CV, Fuhler GM. Targeting Tyrosine Phosphatases by 3-Bromopyruvate Overcomes Hyperactivation of Platelets from Gastrointestinal Cancer Patients. J Clin Med. 2019;8(7). pii: E936. doi: 10.3390/jcm8070936.

Yours sincerely

Gwenny M. Fuhler, PhD

Postal address
 P.O. box 2040
 3000 CA Rotterdam, NL

Visiting address
 Wytemaweg 80
 3015 CN Rotterdam, NL

Car Park
 Wytemaweg 12
 3015 CN Rotterdam

Prof. M.J.Bruno MD PhD
 Department Chair

Clinic
 H.R. van Buuren MD PhD
 D.L. Cahen MD PhD

S. Coenen MD
 S. Danish Murad MD PhD
 W. de Graaf MD PhD
 M.J.A.L. Grubben MD PhD
 L. Hol MD PhD

P.J.F. de Jonge MD PhD
 R.J. de Kragt MD PhD
 A.D. Koch MD PhD
 Prof. R.A. de Man MD PhD
 Prof. H.J. Metselaar MD PhD
 J.W. Poley MD PhD
 V.M.C.W. Spaander MD PhD
 D. Sprongers MD PhD
 P. Taimr MD
 A.C. de Vries MD PhD
 Prof. C.J. van der Woude MD PhD

Laboratory
 Prof. M. Peppelenbosch PhD, head
 P.A. Boonstra PhD
 G.M. Fuhler PhD
 H.R. de Jonge PhD
 J. Kwekkeboom PhD
 M.J.M. Smits PhD
 T. Van Wollegem MD PhD
 A.J. van Vuren PhD
 A.M. Wollman PhD



Medische Ethische Toetsings Commissie
Erasmus MC
www.erasmusmc.nl/commissies/metc/

Mw.dr. V.M.C.V. Spaander
Afdeling Maag,- Darm- en Leverziekten
Kamer Na-610
Erasmus MC

Doorkiesnummer +31 10 7033625/34428
Faxnummer
Kamernummer Ae-337
E-mail metc@erasmusmc.nl
Ons kenmerk CPB/si/364126
Datum 5 september 2018

Betref: MEC-2018-113 Positief besluit NL66029.078.18. v2

Titel onderzoek:

'Tumor-platelet interaction. The cellular and molecular interaction between tumor cells and platelets- role in diagnosis and tumor metastasis.'

Verrichter: Erasmus MC
Singlecenter

Geachte mevrouw Spaander,

De Medisch Ethische Toetsings Commissie Erasmus MC (METC) heeft het bovenvermelde onderzoeksvoorstel ontvangen op 22 mei 2018. Op 12 juni 2018 ontving de commissie nog het monitoringplan.

Besluit

De commissie heeft het onderzoeksvoorstel in het kader van de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen (WMO) besproken in de 1138^e vergadering d.d. 12 juni 2018. Naar aanleiding van deze toetsing heeft de commissie u enkele vragen c.q. opmerkingen voorgelegd. De vragen en opmerkingen zijn naar tevredenheid beantwoord.

De commissie oordeelt **positief** over de uitvoering van het onderzoek in het volgende centrum:

- Erasmus MC te Rotterdam

Alvorens met de uitvoering van het onderzoek in het Erasmus MC gestart mag worden, dient u in het bezit te zijn van toestemming voor de uitvoering van het onderzoek door het afdelingshoofd.

WMO proefpersonenverzekering

De commissie verleent ontheffing van de verplichting een verzekering af te sluiten, die de door het onderzoek veroorzaakte schade van de proefpersoon dekt. De commissie is van oordeel, dat aan dit onderzoek voor de proefpersoon naar zijn aard hooguit verwaarloosbare risico's zijn verbonden.

Postadres

Postbus 2040
3000 CA Rotterdam

Bezoekadres

Dr. Molewaterplein 40
3015 GD Rotterdam

Contact & route

www.erasmusmc.nl

Voorzitters

Prof.dr. H.W. Tilanus
Prof.dr. H.J. Metselaar

Secretarissen

Mw. mr. C.P. Bron-van Vliet
Mw.drs. N. Loekabino
Mw.dr. F.M. Spoelstra
Mw.ing. W.C.M. Tielemans

Secretarissen

Mw. A. de Jong
Mw. S. Sneevliet
Mw. C.R.J. Laban-van der Velden

Het secretariaat is
geopend van maandag
tot en met vrijdag
van 08.30 tot 17.00 uur

Pagina 2/3

Ons kenmerk CPB/sl/364126

Datum 5 september 2018



Melden

De volgende gegevens moeten aan de commissie worden gemeld:

- Startdatum (datum waarop de eerste proefpersoon is geïncludeerd)
- Einde inclusie (datum waarop de laatste proefpersoon is geïncludeerd)
- Einddatum (datum waarop de laatste meting bij de laatste proefpersoon heeft plaatsgevonden)

Voorleggen ter beoordeling

De volgende documenten moeten aan de commissie ter beoordeling worden voorgelegd:

- Onverwachte en ernstige bijwerkingen via portal ToetsingOnline
- Amendementen en/of addenda
- Formulier Jaarlijkse voortgangsrapportage, voor het eerst één jaar na dit besluit
- Publicaties en eindrapport

BROK cursus

Voorts wijst de commissie de onderzoekers erop dat, conform landelijke afspraken, klinisch onderzoekers verplicht zijn de "Basiscursus regelgeving en organisatie van klinisch onderzoek" (BROK) te doorlopen en het bijbehorende certificaat te behalen. De commissie gaat ervan uit dat, indien dit nu nog niet het geval is, de klinisch onderzoekers van deze studie maximaal 6 maanden na aanvang van de studie aan deze verplichting voldaan hebben. Voor informatie over de BROK-cursusdata kunt u contact opnemen met het Congresbureau, intern tel.nr. 43584.

Beroep

Tot slot wijs ik u erop, dat op grond van artikel 23 van de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen juncto artikel 7: 1 van de Algemene wet bestuursrecht, degene wiens belang rechtstreeks bij dit besluit is betrokken daartegen binnen zes weken na de dag waarop dit besluit bekend is gemaakt, een administratief beroepschrift kan indienen bij de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek. Een dergelijk administratief beroepschrift dient u te adresseren aan: CCMO, Postbus 16302, 2500 BH Den Haag.

Geldigheid besluit

De commissie heeft de bevoegdheid haar positieve besluit in te trekken als vaststaat dat de uitvoering van het onderzoek ernstig tekortschiet. Het positieve besluit van de commissie verliest geldigheid als met de uitvoering van het onderzoek niet is begonnen binnen één jaar nadat dit besluit is genomen.

Met vriendelijke groet,
namens de Medisch Ethische Toetsings Commissie Erasmus MC,

Mw. mr. C.P. Bron – van Vliet
Secretaris

Pagina 3/3

Ons kenmerk CPB/1364126

Datum 5 september 2018

**Beoordeelde documenten**

- A1. Aanbiedingsbrief onderzoeksvoorstel hoofdonderzoeker mw.dr. V.M.C.V. Spaander en afdelingshoofd prof.dr. M.J. Bruno d.d. 8 mei 2018;
- A1. Antwoordbrief d.d. 14 augustus 2018;
- B1. ABR-formulier NL66029.078.18 v2 d.d. 14 augustus 2018;
- B2. Addendum bij ABR-formulier zoals ontvangen d.d. 22 mei 2018;
- C1. Onderzoeksprotocol v2 d.d. 14 augustus 2018;
- E1. Patiënteninformatie- en toestemmingsformulier V2 d.d. 13 augustus 2018;
- E1. Informatie- en toestemmingsformulier gezonde proefpersonen V2 d.d. 14 augustus 2018;
- E3. Wervingstekst gezonde vrijwilligers zoals ontvangen d.d. 21 augustus 2018;
- G2. Certificaat d.d. december 2014 inzake aansprakelijkheidsverzekering Erasmus MC;
- H1. Curriculum vitae onafhankelijke arts dr. S.Y. Lam;
- H2. Curriculum vitae hoofdonderzoeker mw.dr. V.M.C.V. Spaander;
- H2. Curriculum vitae coördinerend onderzoeker mw.dr. G.M. Fuhler; en
- K6. Monitoringplan classificatie Verwaarloosbaar risico d.d. 7 juni 2018 inclusief bijlage A.

Samenstelling METC Erasmus MC

Mw.mr. C.P. Bron-van Vliet	Secretaris
Mw.dr. E.M. Bunnik-Sweijts	Ethicus
Mw.mr. A.M. den Hertog-de Visser	Gezondheidsjurist
Dr. J. Hofland	Internist-endocrinoloog
Dr. ir. W.C.J. Hop	Methodoloog
Dr. S.L.W. Koolen	Ziekenhuisapotheker / Klinisch farmacoloog
Mw.dr. M. Littel	Psycholoog
Prof.dr. H.W. Tilanus (voorzitter)	Chirurg
Dr. M. Witsenburg	Cardioloog
Mw.drs. H.S. Wijnker	Invalshoek proefpersoon / Extern lid

Bijlage Certificaat d.d. december 2014 inzake aansprakelijkheidsverzekering Erasmus MC

Cc. Digitale verzending

Prof.dr. M.J. Bruno
 Mw.dr. G.M. Fuhler
 Trialbureau MDL
 CCMO

MEC-2018-113

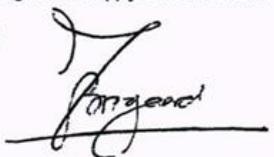
Single center

Centra Med
Zorgvuldig

Verzekeringcertificaat

Verzekeraar: Onderlinge Waarborgmaatschappij Centramed B.A.
 Polisnummer: 626.107.141
 Type verzekering: Medische aansprakelijkheidsverzekering
 Verzekeringnemer: Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam
 Verzekerden: Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam inclusief aan haar gelieerde rechtspersonen (met uitzondering van het Havenziekenhuis), gekwalificeerde personen die werkzaamheden verrichten in opdracht van of namens Erasmus MC waaronder begrepen maar niet beperkt tot bestuursleden, werknemers, stagiaires, vrijwilligers, studenten, gastoperateurs, gedetacheerden, co-assistenten en arts-assistenten, leden van het Mobiel Medisch Team en leden van (ethische) commissies.
 Verzekerd: Medische beroepsaansprakelijkheid
 Verzekerde som: € 2.500.000 als maximum per aanspraak, met een maximum van € 10.000.000 per jaar
 Voorwaarden: Polisvoorwaarden Centramed 2014 Rubriek A in combinatie met de tussen Erasmus MC en Centramed afgesloten overeenkomst van 19 november 2014.
 Ingangsdatum: 1 januari 2015
 Verzekeringstermijn: De verzekering is aangegaan tot 1 januari 2019

Onderlinge Waarborgmaatschappij Centramed B.A.
 Postbus 191
 2270 AD Voorburg



Voorburg, december 2014

Mw. mr. C.P. Bron-van Vliet
 secretaris Medisch Ethische Toetsingscommissie
 Erasmus MC
 Rotterdam

www.centramed.nl

5 septem ber 2018





University of Campinas - UNICAMP
Institute of Biology
Department of Biochemistry and Tissue Biology
OncoBiomarkers Lab



Declaração de Responsabilidade de Bioética

Campinas, SP
23 de Outubro de 2020

Eu, Alessandra Valéria de Sousa Faria, portadora do RA120703, declaro que parte da minha tese apresenta dados com material de seres humanos que foram obtidos e utilizados somente durante o período de realização de estágio no exterior (Gastroenterology Department, Erasmus Medical Center, University of Rotterdam), sob aprovação do comitê de ética de Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands, número NL66029.078.18. Informo que estou ciente que sob qualquer atitude contrária ao descrito acima, pode fazer incorrer nos artigos do código penal sobre falsificação de documento público ("Art. 297 - Falsificar, no todo ou em parte, documento público, ou alterar documento público verdadeiro") e falsidade ideológica ("Art. 299 - Omitir, em documento público ou particular, declaração que dele devia constar, ou nele inserir ou fazer inserir declaração falsa ou diversa da que devia ser escrita, com o fim de prejudicar direito, criar obrigação ou alterar a verdade sobre fato juridicamente relevante").

A handwritten signature in black ink, appearing to read "afaria", written over a horizontal line.

Nome da aluna:
Alessandra Valeria de Sousa Faria

A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. Veríssima", written over a horizontal line.

Nome da orientadora:
Carmen Veríssima Ferreira Halder

2. Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **PRIMEIRA ETAPA DA DISSEMINAÇÃO HEMATOGENICA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE COLORRETAL: INFLUÊNCIA DE PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES E DO 3-BROMOPIRUVATO**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de outubro de 2020

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Alessandra Valeria de Sousa Faria**
RG n.º 40.887.836-8

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Carmen Verissima Ferreira Halder**
RG n.º 56.282.057-7