



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALINE ELIDE DA SILVA BARBOSA

MITOXANTRONA MODULA *HALLMARKS* DO CÂNCER  
COLORRETAL: EFEITO WARBURG E PROTEÍNA TIROSINA  
FOSFATASE DE BAIXO PESO MOLECULAR (LMWPTP)

“MITOXANTRONE DOWNMODULATES COLORECTAL CANCER  
HALLMARKS: EFFECT WARBURG AND LOW MOLECULAR WEIGHT  
PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE (LMWPTP)”

CAMPINAS

2024

**ALINE ELIDE DA SILVA BARBOSA**

**MITOXANTRONA MODULA HALLMARKS DO CÂNCER  
COLORRETAL: EFEITO WARBURG E PROTEÍNA TIROSINA  
FOSFATASE DE BAIXO PESO MOLECULAR (LMWPTP)**

**“MITOXANTRONE DOWNMODULATES COLORECTAL CANCER  
HALLMARKS: EFFECT WARBURG AND LOW MOLECULAR WEIGHT  
PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE (LMWPTP)”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional, na área de Bioquímica.

*Dissertation presented to the Institute of Biology at the State University of Campinas as part of the requirements for obtaining the Master's Degree in Molecular and Morphofunctional Biology, in the field of Biochemistry.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira-Halder

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA ALINE ELIDE  
DA SILVA BARBOSA, E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. CARMEN VERÍSSIMA  
FERREIRA-HALDER.

**CAMPINAS**

**2024**

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

B234m Barbosa, Aline Elide da Silva, 1999-  
Mitoxantrona modula hallmarks do câncer colorretal : efeito Warburg e proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMWPTP) / Aline Elide da Silva Barbosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

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

1. Neoplasias gastrointestinais. 2. Glicose - Metabolismo. 3. Proteína tirosina fosfatase. 4. Mitoxantrona. I. Ferreira, Carmen Veríssima, 1969-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Mitoxantrone downmodulates colorectal cancer hallmarks : effect Warburg and low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMWPTP)

**Palavras-chave em inglês:**

Gastrointestinal neoplasms

Glucose - Metabolism

Protein-tyrosine phosphatase

Mitoxantrone

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional

**Banca examinadora:**

Carmen Veríssima Ferreira Halder [Orientador]

Valquiria Aparecida Matheus

Valéria Scorsato

**Data de defesa:** 26-02-2024

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Molecular e Morfofuncional

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4318-8165>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/6437053703820576>

Campinas, 26 de Fevereiro de 2024

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira-Halder

Profa. Dra. Valquiria Aparecida Matheus

Dra. Valéria Scorsato

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

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

*Aos pacientes acometidos pelo câncer, cuja  
incansável luta inspira esta pesquisa  
consagrada à busca de avanços científicos  
na oncologia.*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Aparecida de Jesus da Silva.

À minha orientadora no Brasil, Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira-Halder, pela sua eximia orientação a qual iniciou-se na minha Iniciação Científica e perpetua até este momento. Agradeço pelos seus ensinamentos, incentivo e apoio. Ainda sou grata pela sua empatia e solidariedade frente aos meus problemas de saúde durante o meu mestrado.

À minha orientadora na Holanda, Dra. Gwenny Fuhler, por me receber na *Erasmus Medical Center Rotterdam*, e disponibilizar seu laboratório, tempo, equipe e conhecimentos. Sou grata a esta maravilhosa oportunidade concedida, na qual pude crescer profissionalmente e pessoalmente.

Às minhas amigas Kemilly Percidio, Larissa Raizer e Raíssa Ferreira que me acompanham desde o colegial. Agradeço a amizade incondicional que me ofereceram durante a minha trajetória na ciência, me lembrando que sou capaz e que posso conquistar o mundo se este for meu desejo.

Ao MSc. Thiago Rodrigues, o qual sempre me incentivou a conquistar meus sonhos profissionais, acadêmicos e pessoais. Pelo companheirismo, parceria, cumplicidade e apoio durante meus momentos difíceis e/ou até mesmo quase impossíveis. Seus conhecimentos científicos foram relevantes para o meu aprendizado durante o mestrado.

À Luiza Ortega pela sua excelente assistência médica. Foi imprescindível seu profissionalismo e competência para a minha recuperação.

Aos meus colegas atuais e que já deixaram o Laboratório *OncoBiomarkers* participando ativamente na passagem de perícia nesta área de estudo, os quais pude com prazer recebê-los. Agradeço também à equipe técnica laboratorial pelo apoio e suporte, que tornaram possíveis os experimentos aqui desenvolvidos.

Às Dras. Thaís Pinto e Geórgia Feltran pela receptividade, paciência e conhecimentos compartilhados além das conversas regadas de chocolate quente na Holanda.

À banca examinadora deste trabalho, pela disponibilidade, contribuições e empenho visando o aperfeiçoamento desta dissertação.

Às instituições que viabilizaram a realização deste estudo: a Universidade Estadual de Campinas, o Instituto de Biologia, o Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional, o Hospital *Erasmus Medical Center Rotterdam* e o *Department of Gastroenterology and Hepatology*.

Ao meus professores e mestres, em especial as Profas. Dras. Graziela Renata Stoppa, Taís Rondello Bonatti, Klélia Aparecida Carvalho, Eleonora Feracin da Silva Picoli e Carmen Veríssima Ferreira-Halder que contribuíram ativamente nesta trajetória de minha formação, ampliando meu conhecimento em diversos campos, me fazendo pensar e refletir.

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2015/20412-7; 2020/04409-4 e Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 161054/2021-8.

Ainda, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES): Código de Financiamento 001.

Por fim, gostaria de agradecer a Aline do passado. Agradeço a tua inabalável coragem durante os momentos de extrema dificuldade. Tua perseverança moldou meu mestrado e iluminou nosso caminho.

## RESUMO

De maneira geral, os cânceres gastrointestinais surgem de lesões displásicas benignas, e a partir de mutações subsequentes progridem para lesões malignas. Fatores genéticos, ambientais não hereditários e hábitos de vida influenciam na patogênese desses cânceres. No presente estudo foram utilizados como modelos, os cânceres de esôfago e de colorretal. Especificamente, o câncer colorretal é a segunda principal causa de morte globalmente, sendo a metástase e a resistência à quimioterapia as principais causas da elevada taxa de mortalidade. Em relação ao câncer de esôfago, o mesmo ocupa a sétima posição em incidência e a sexta em mortalidade. Dados os desafios, em termos de opções e respostas terapêuticas dos cânceres de esôfago e colorretal, nosso grupo de pesquisa tem focado no estudo da resposta das células de cânceres gastrointestinais ao tratamento com quimioterápicos de baixo custo, como a mitoxantrona, bem como seus impactos em mediadores moleculares associados à sobrevivência celular. Portanto, o presente estudo teve como objetivos: a) investigar o efeito da mitoxantrona na viabilidade das linhagens celulares de câncer colorretal e de esôfago; b) avaliar os efeitos da mitoxantrona em enzimas associadas ao efeito Warburg (proteína tirosina fosfatase de baixo molecular - LMWPTP- e enzimas glicolíticas) em células de câncer colorretal. A mitoxantrona apresentou efeito considerado na diminuição da sobrevivência das células de câncer colorretal (HT29 e HCT116) e da linhagem de câncer de esôfago (TE-8 e ESO26), quando considerado o parâmetro bioquímico, redução do MTT. De forma interessante, no caso do câncer colorretal, observou-se que a mitoxantrona além de induzir a morte das células HT29 e HT116, diminuiu a quantidade da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular e as atividades das enzimas glicolíticas: lactato desidrogenase e piruvato quinase. De forma interessante, as análises de docagem molecular também indicaram dois sítios de interações entre a mitoxantrona e a proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular, o sítio ativo e os sítios regulatórios da enzima. Tais achados apontam, pela primeira vez, a ação da mitoxantrona na modulação negativa da LMWPTP, enzima que tem sido considerada como relevante para a progressão de diferentes cânceres.

**Palavras-chave:** Câncer gastrointestinal; Metabolismo glicolítico; Tirosina Fosfatase; Mitoxantrona.

## ABSTRACT

In general, gastrointestinal cancers arise from benign dysplastic lesions, and from subsequent mutations progress to malignant lesions. Genetic, non-hereditary environmental factors and lifestyle habits influence the pathogenesis of these cancers. In the present study, esophageal and colorectal cancers were used as models. Specifically, colorectal cancer is the second leading cause of death globally, with metastasis and resistance to chemotherapy being the main causes of the high mortality rate. In relation to esophageal cancer, it ranks seventh in incidence and sixth in mortality. Given the challenges in terms of therapeutic options and costs for esophageal and colorectal cancers, our research group has focused on studying the response of gastrointestinal cancer cells to treatment with low-cost chemotherapy drugs, such as mitoxantrone, as well as its impacts on molecular mediators associated with cell survival. Therefore, the present study aimed to: a) investigate the effect of mitoxantrone on the viability of colorectal and esophageal cancer cell lines; b) evaluate the effects of mitoxantrone on enzymes associated with the Warburg effect (low molecular protein tyrosine phosphatase - LMWPTP and glycolytic enzymes) in colorectal cancer cells. Mitoxantrone had a significant effect on reducing the survival of colorectal cancer cells (HT29 and HCT116) and esophageal cancer cells (TE-8 and ESO26), when considering the biochemical parameter, reduction of MTT. Interestingly, in the case of colorectal cancer, it was observed that mitoxantrone, in addition to inducing the death of HT29 and HT116 cells, decreased the amount of LMWPTP and the activities of glycolytic enzymes: lactate dehydrogenase and pyruvate kinase . Interestingly, molecular docking analyzes also indicated two sites of interactions between mitoxantrone and LMWPTP, the active site and the regulatory sites of the enzyme. These findings point out, for the first time, the action of mitoxantrone in the negative modulation of LMWPTP, an enzyme that has been considered relevant for the progression of different cancers.

**Keywords:** Gastrointestinal cancer; Glycolytic metabolism; Tyrosine Phosphatase; Mitoxantrone.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Reações catalisadas pelas proteínas quinases (PKs) e proteínas fosfatases (PPs).	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de um substrato, especificamente uma proteína fosforilada no resíduo de tirosina (fosfotirosina), da proteína tirosina fosfatase (PTP).	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Publicações do nosso grupo de pesquisa sobre a LMWPTP em diferentes tipos de cânceres.	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Metabolismo da glicose e o efeito Warburg.	<b>27</b>
<b>Figura 5.</b> Estrutura molecular da mitoxantrona (MTX). Fórmula: $C_{22}H_{28}N_4O_6$	<b>30</b>
<b>Figura 6.</b> Progressão neoplásica sequência adenoma-carcinoma.	<b>43</b>
<b>Figura 7.</b> Imagens representativas das células de câncer de colorretal.	<b>50</b>
<b>Figura 8.</b> Fluxograma da metodologia geral utilizada neste estudo.	<b>50</b>
<b>Figura 9.</b> Viabilidade das células de câncer colorretal (CRC) expostas à mitoxantrona.	<b>57</b>
<b>Figura 10.</b> A mitoxantrona induz a morte das células de câncer colorretal.	<b>58</b>
<b>Figura 11.</b> Mitoxantrona impacta negativamente o nível da proteína tirosina de baixo peso molecular (LMWPTP) nas células de câncer de colorretal.	<b>60</b>
<b>Figura 12.</b> Interação MWPTP-MTX através do sítio ativo.	<b>61</b>
<b>Figura 13.</b> O tratamento com mitoxantrona afeta negativamente a atividade de enzimas glicolíticas em células de câncer colorretal.	<b>62</b>
<b>Figura 14.</b> Patogênese e fisiopatologia do carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma.	<b>72</b>
<b>Figura 15.</b> Estimativas da incidência dos cânceres e da mortalidade causada pelos mesmos para o ano de 2020.	<b>75</b>
<b>Figura 16.</b> Efeito da mitoxantrona nas linhagens celulares ESCC TE-7, TE-8, TE-10 e TE-13.	<b>89-90</b>
<b>Figura 17.</b> Efeito da mitoxantrona nas linhagens celulares EAC FLO-1, OE33, ESO26 e JH-ESOAD1.	<b>91-92</b>
<b>Figura 18.</b> Impacto da mitoxantrona na adesão das células JH-ESOAD1 e TE-7.	<b>93</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Superfamília das proteínas tirosina fosfatases (PTPs): classes e seus respectivos substratos.	<b>22</b>
<b>Tabela 2.</b> Número estimado de novos casos e mortes em 2020 para câncer de cólon e reto, ambos os sexos, todas as idades.	<b>45</b>
<b>Tabela 3.</b> Principais vias de sinalização sujeitas a mutações no câncer colorretal (CRC).	<b>46</b>
<b>Tabela 4.</b> Hipóteses e objetivos acerca dos efeitos da mitoxantrona (MTX) no câncer colorretal (CRC).	<b>48</b>
<b>Tabela 5.</b> Linhagens celulares de câncer colorretal humano, suas características genéticas e origem.	<b>49</b>
<b>Tabela 6.</b> Anticorpos utilizados na análise de proteínas por <i>Western Blotting</i> .	<b>53</b>
<b>Tabela 7.</b> Principais resultados obtidos a partir da perspectiva molecular.	<b>63</b>
<b>Tabela 8.</b> Número estimado de novos casos e mortes em 2020 para câncer esôfago, ambos os sexos, todas as idades.	<b>75</b>
<b>Tabela 9.</b> Linhagens celulares de câncer de esôfago humano, suas características genéticas e a doença associada.	<b>79</b>
<b>Tabela 10.</b> Especificações detalhadas dos meios de cultura associados a cada linhagem.	<b>82</b>
<b>Tabela 11.</b> Efeito da mitoxantrona sobre as células derivadas de carcinoma e adenocarcinoma esofágico.	<b>86</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACP1</b>	<i>Acid Phosphatase 1</i>
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>AKT</b>	Proteína Quinase B
<b>CRC</b>	Câncer Colorretal
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EAC</b>	Adenocarcinoma
<b>EC</b>	Câncer de Esôfago
<b>ESCC</b>	Carcinoma de Células Escamosas
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>Glicose-6P</b>	Glicose-6 fosfato
<b>GLUT-1</b>	Transportador de Glicose Tipo 1
<b>HK</b>	Hexoquinase
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator Induzido por Hipóxia-1 $\alpha$
<b>LDH</b>	Lactato Desidrogenase
<b>LMWPTP</b>	Proteína Tirosina Fosfatase de Baixa Peso Molecular
<b>mTOR</b>	Proteína Quinase Ativado por Mitogenos
<b>MKP</b>	Proteína Fosfatase de Mapaquinase
<b>MLL2</b>	<i>Mixed Lineage Leukemia 2</i>
<b>MTX</b>	Mitoxantrona
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
<b>NFE2L2</b>	<i>Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2</i>
<b>NOTCH1</b>	<i>Notch Receptor 1</i>
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase
<b>PK</b>	Proteína Quinase
<b>PP</b>	Proteína Fosfatase
<b>PKM2</b>	Proteína Quinase M2
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>p-Ser</b>	Fosfoserina

<b>p-Thr</b>	Fosfotreonina
<b>p-Tyr</b>	Fosfotirosina
<b>PTK</b>	Proteína Tirosina Quinase
<b>PTP</b>	Proteína Tirosina Fosfatase
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>SDHA</b>	Subunidade A do Complexo II da Succinato Desidrogenase
<b>SSH</b>	Secure Shell
<b>TCA</b>	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
<b>TGFBR2</b>	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 2</i>
<b>TOPII</b>	Topoisomerase II
<b>TP53</b>	<i>Tumor Protein P53</i>
<b>VDAC</b>	Canal de Ânion Dependente de Voltagem
<b>ZNF750</b>	<i>Zinc Finger Protein 750</i>

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL**

---

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. CÂNCER	17
1.2. VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR	18
1.2.1. PROTEÍNAS QUINASES/FOSFATASES	19
1.2.2. PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE	20
1.2.3. CLASSE II - PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BAIXO PESO MOLECULAR (LMWPTP)	22
1.2.4. CONTRIBUIÇÃO DO NOSSO GRUPO NO ENTENDIMENTO DO PAPEL DA LMWPTP NO CÂNCER	23
1.3. REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA E O EFEITO WARBURG	25
1.4. MITOXANTRONA	29
1.5. MODELOS DE CULTURA 2D vs 3D	31
1.6. CÂNCER GASTROINTESTINAL	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

### **CAPÍTULO 2: CÂNCER DE COLORRETAL**

---

RESUMO	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	41
1.1. CÂNCER COLORRETAL	41
1.2. FATORES DE RISCO	42
1.3. EPIDEMIOLOGIA	44
1.4. VIAS DE SINALIZAÇÃO ALTERADAS E ONCOGENES DO CÂNCER COLORRETAL	46
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVO	48
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49

4.1. MATERIAIS	49
4.1.1. REAGENTES	49
4.1.2. LINHAGENS CELULARES	49
4.2. MÉTODOS	50
4.2.1. CULTURA CELULAR	50
4.2.2. ESFEROIDES	51
4.2.3. IMUNOFLOURESCÊNCIA	51
4.2.4. ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR PELA REDUÇÃO DO MTT	52
4.2.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	52
4.2.6. DOCAGEM MOLECULAR	53
4.2.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
5. RESULTADOS	55
5.1. Mitoxantrona diminui a sobrevivência das células de câncer colorretal.	55
5.2. Células tratadas com mitoxantrona apresentam diminuição da expressão da LMWPTP.	59
5.3. Mitoxantrona altera a atividade das enzimas do metabolismo da glicose.	61
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

### **CAPÍTULO 3: RASTREAMENTO DA RESPOSTA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ESÔFAGO À MITOXANTRONA**

---

1. INTRODUÇÃO	71
1.1. CÂNCER DE ESÔFAGO	71
1.2. FATORES DE RISCO	73
1.2.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS	73
1.2.2. ADENOCARCINOMA	73
1.3. EPIDEMIOLOGIA	74
1.4. LINHAGENS DE ESÔFAGO	76
1.4.1. METABOLISMO	76
1.4.2. GÊNÉTICA	77
2. JUSTIFICATIVA	80

3. OBJETIVO	81
4. MÉTODOS	82
4.1. CULTURA CELULAR	82
4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA E DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	82
4.3. ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR PELA REDUÇÃO DO MTT	83
4.4. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR	83
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	84
5. RESULTADOS	85
5.1. Impacto da mitoxantrona nas linhagens celulares ESCC e EAC.	85
6. CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO I: DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E/OU BIOSSEGURANÇA</b>	<b>105</b>
<hr/>	
<b>ANEXO II: DECLARAÇÃO DOS DIREITOS AUTORAIS</b>	<b>106</b>
<hr/>	

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

---

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. CÂNCER

Atualmente, o câncer é uma das principais causas de mortalidade, afetando principalmente indivíduos de <70 anos, em mais de 100 países. De fato, segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer é a segunda causa mais frequente de óbito. Em uma perspectiva numérica, em 2020 foram registrados, mundialmente, aproximadamente 10 milhões de mortes e 19,3 milhões de novos casos (SUNG et al., 2021). Há mais de 200 milhões de anos, essa afecção tem afetado o *Homo sapiens* e ao longo dos séculos, hipóteses e teorias surgiram para explicar os fatores que levam a sua origem. A teoria mais aceita é embasada nas alterações moleculares e epigenéticas que se acumulam ao longo do tempo (PADUCH, 2015). Devido a essas alterações, as células cancerígenas perdem a capacidade de regular finamente as vias de sinalização responsáveis pelo controle da progressão do ciclo celular, com consequente favorecimento da proliferação exacerbada dessas células (ALZAHIRANI; AL DOGHAITHER; AL-GHAFAR, 2021).

A gênese do câncer detém três estágios clássicos: I) iniciação, II) promoção e III) proliferação. A iniciação – ocorre devido às danificações na molécula de DNA induzidas de forma direta ou indireta pelos agentes carcinogênicos, como radiação, químicos e vírus. Além dessa alteração molecular, estes agentes ativam oncogenes e/ou desativam os genes supressores de tumor, levando a desregulação na progressão do ciclo celular e à inibição da morte celular programada (apoptose). Em seguida, temos a promoção – caracterizada pela proliferação das células ininterruptamente com as alterações moleculares advindas da iniciação. Durante esse estágio, as células-filhas herdam essas alterações de suas células-mãe. Por fim, temos a progressão – agora, estas células-filhas adquirem fenótipos que permitem a sua manutenção bem como a proliferação, além da migração, invasão e metástase. É relevante salientar que uma única alteração molecular não é suficiente para desencadear o desenvolvimento do câncer; portanto, o câncer surge do acúmulo de alterações moleculares nos genes da célula (CHIAL et al., 2008; TOMMELEIN et al., 2015; KOBAYASHI et al., 2019; ALZAHIRANI; AL DOGHAITHER; AL-GHAFAR, 2021).

Em uma revisão literária, Hanahan e Weinberg (2000; 2011) descreveram as características biológicas conhecidas como "*hallmarks*" ou "marcadores do câncer", responsáveis pela gênese, desenvolvimento e manutenção do câncer. Essas características englobam desde alterações nas vias de sinalização celular até a supressão de genes antitumorais, resistência à apoptose, indução de angiogênese, invasão e metástase, reprogramação metabólica (em especial, a glicose), evasão do sistema imunológico e indução de estado inflamatório crônico no microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

## 1.2. VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

A compreensão das vias de sinalização celular é fundamental para a elucidação dos mecanismos correlacionados às patogêneses. A sinalização permite a detecção e resposta aos estímulos extracelulares. Para que ocorra uma resposta, as células devem ser capazes de perceber e reagir a estes estímulos, sendo tal processo mediado pela transdução de sinal. A transdução de sinal representa, por sua vez, uma sequência precisa de eventos moleculares que convertem um estímulo inicial em uma resposta celular, regulando, conseqüentemente, diversas funções como: metabolismo, divisão, diferenciação, morte e migração. A ativação das vias de transdução, em sua maioria, se inicia quando um ligante específico interage com seu receptor na membrana celular, desencadeando a condução do estímulo para outras partes da célula, através dos mensageiros secundários e ativação de enzimas específicas, culminando na ativação de fatores de transcrição e na alteração do metabolismo, por exemplo. Esses fatores exercem controle da expressão de genes codificadores de proteínas essenciais, pertencentes a uma variedade de vias intracelulares de suma importância para a manutenção e proliferação da célula (KRASIN; DAVIDOFF, 2006; HARVEY, 2018).

A disfunção nas vias de sinalização favorece não apenas a proliferação exacerbada das células cancerígenas e interfere na supressão tumoral, mas também contribui significativamente com outros *hallmarks* supracitados (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). A disfunções nas vias de sinalização são fatores centrais no desencadeamento e progressão do câncer: (1) superexpressão dos receptores de fatores de crescimento, podendo resultar no aumento desenfreado da proliferação celular, exacerbando a condição maligna; (2) alterações moleculares nos genes *Ras*, frequentemente detectadas em variados tipos de cânceres, sustentando uma ativação crônica da via Ras, intrinsecamente ligada ao crescimento celular desregulado; (3) a complexa interação entre quinases e fosfatases, regulando a fosforilação de

proteínas-chave nas vias de transdução de sinal, desempenhando um papel crucial no equilíbrio entre a ativação e a desativação das vias de sinalização; (4) apoptose, mecanismo de morte celular programada, assume um papel crucial na eliminação de células danificadas ou potencialmente prejudiciais, e, na condição de sua desregulação com a redução dos fatores pró-apoptóticos, apresenta uma significativa contribuição para o desenvolvimento do câncer, permitindo a sobrevivência de células anormais no organismo afetado (HARVEY, 2018).

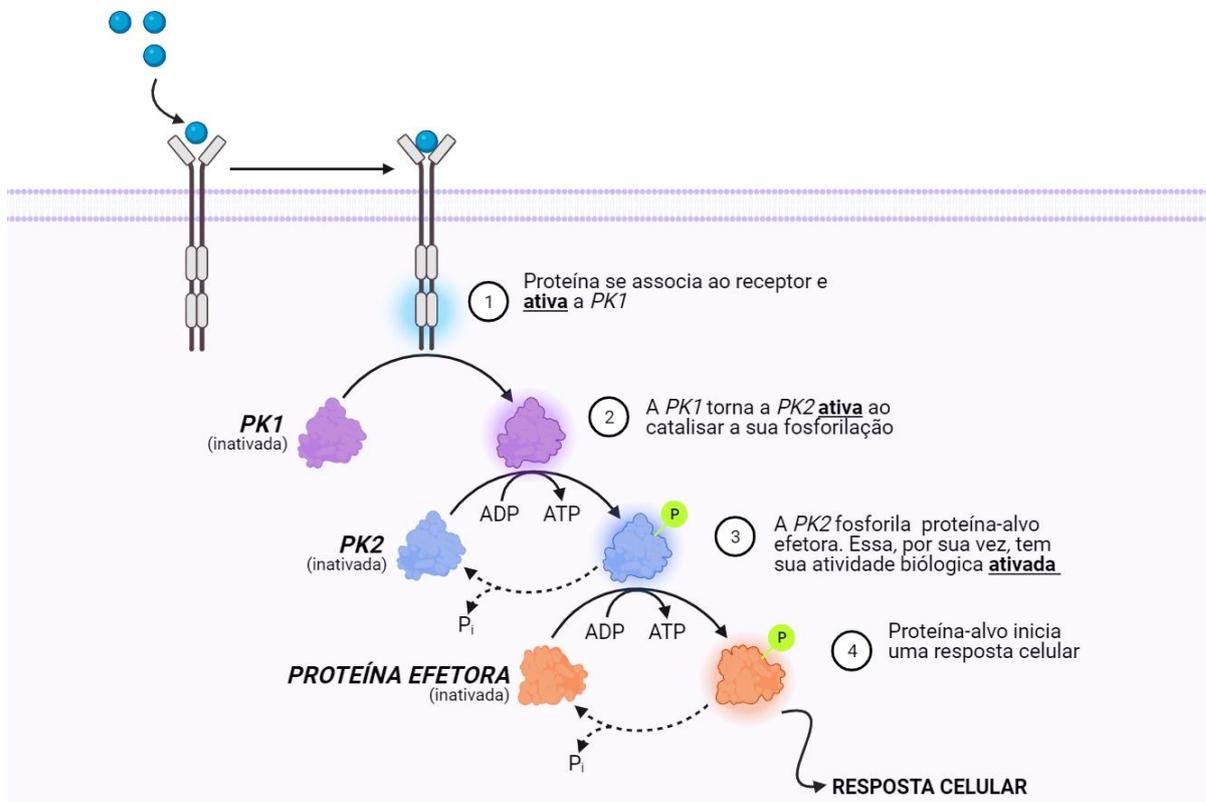
### **1.2.1. PROTEÍNAS QUINASES/FOSFATASES**

A fosforilação e a desfosforilação de proteínas assumem um papel chave nas vias de sinalização celular, sendo esse mecanismo regulado pelas proteínas quinases (PK) e proteínas fosfatases (PPs) (HUNTER, 1995). Embora ambos os grupos de enzimas atuem como fosfotransferases, tanto as PKs quanto as PPs desencadeiam reações opostas que modulam a estrutura e função de diversas proteínas nas células (Figura 1). Neste sentido, a fosforilação/desfosforilação com sua capacidade de modular a atividade de enzimas e facilitar a interação proteína-proteína, emerge como uma das principais modificações pós-traducionais na influência e regulação de uma miríade de eventos biológicos, como divisão celular, diferenciação, desenvolvimento, morte celular, metabolismo, expressão gênica, contração e locomoção celular (CHENG et al., 2011; LICHEVA et al., 2022).

Em nível molecular, as PKs catalisam a transferência de grupos fosfato do substrato adenosina-5'-trifosfato (ATP) para moléculas específicas, como proteínas ou lipídios. Em contrapartida, as PPs executam o processo inverso, removendo estes grupos fosfato utilizando uma molécula de água (hidrólise). Assim, a fosforilação é um processo no qual grupo fosfato é caracteristicamente (ou especificamente) adicionado a resíduos dos aminoácidos serina, treonina ou tirosina que compõem as proteínas, estabelecendo ligações fosfoéster (O-fosfato) que, por sua vez, têm o poder de modular as funções das proteínas ao induzir mudanças conformacionais (CHENG et al., 2011).

Desequilíbrios na fosforilação podem resultar em disfunções nas vias celulares fundamentais, tais como proliferação e diferenciação celular, desencadeando o desenvolvimento de afecções complexas dentre as quais, o câncer. É notável a frequente ocorrência de alterações nos genes codificadores das PKs e PPs, produtos de alterações moleculares pontuais, desregulações epigenéticas e, ainda, alterações cromossômicas que

afetam regiões críticas desses genes, consolidando seu papel na patogênese e fisiopatologia de diversos tipos de cânceres (ALHO et al., 2013).

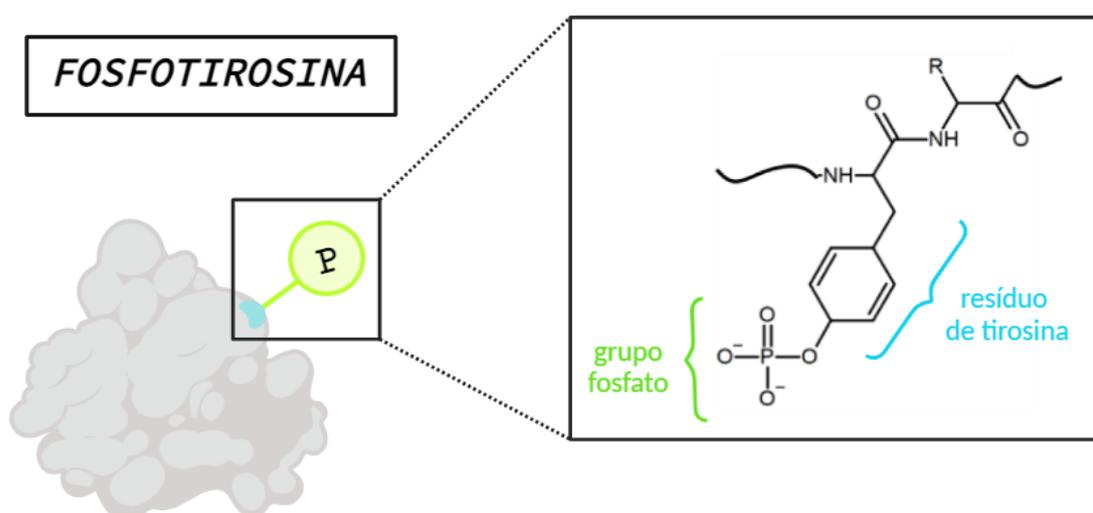


**Figura 1. Reações catalisadas pelas proteínas quinases (PKs) e proteínas fosfatases (PPs).** Uma série de proteínas em uma via é fosforilada em uma cascata de ativação que gera uma resposta celular. Nas reações bioquímicas o ATP é convertido em ADP pela PK, levando à fosforilação de uma proteína. Em contrapartida, a PP libera um íon fosfato ( $P_i$ ), resultando na desfosforilação dessa proteína. Essa intrincada regulação fosforilação/desfosforilação desempenha um papel vital na modulação fina da atividade proteica, influenciando cascatas de sinalização e contribuindo para a homeostase celular. *Ilustração realizada com a ferramenta BioRender.*

### 1.2.2. PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE

A literatura descreve as PPs como uma extensa família de enzimas, cuja complexidade e diversidade estrutural se assemelham às PKs. Classificadas com base em critérios que envolvem função, estrutura, sequência, especificidade, ativadores e inibidores, as PPs podem ser categorizadas em dois grandes grupos: proteínas serina/treonina fosfatases e proteínas tirosina fosfatases (PTPs) (Figura 2). No que tange às PTPs, alguns membros são importantes supressores tumorais, revertendo os efeitos adversos das proteínas tirosina quinases (PTKs), enquanto outros, podem agir como oncoproteínas, atuando como supressora tumoral nos

processos de sinalização através da desfosforilação e ativação das PTKs (LACZMANSKA; SASIADEK, 2011). Essas enzimas desempenham um papel fundamental na modulação das vias de sinalização, podendo amplificar ou inibir tais processos, dependendo da fosforilação para ativação ou inibição de suas funções proteicas (HE et al., 2014). Ainda, as PTPs pertencem a uma família de enzimas composta por 107 membros (Tabela 1), subdivididos em 4 classes com base em suas sequências proteicas e funções. Em ordem numérica temos: A classe I, é a mais ampla (Tabela 1A); em seguida classe II, representada por um único membro (PTP de baixo peso molecular – LMWPTP) (Tabela 1B); a classe III, com apenas três membros (Tabela 1C); e, por fim, a classe IV que compreende quatro membros que se destacam por possuir resíduo de ácido aspártico como grupo catalítico, uma particular característica que as distingue das demais PTPs (Tabela 1D) (HE et al., 2014).



**Figura 2. Representação esquemática de um substrato, especificamente uma proteína fosforilada no resíduo de tirosina (fosfotirosina), da proteína tirosina fosfatase (PTP).** A proteína alvo, exibe um resíduo de tirosina fosforilado, representado por um círculo com uma "P" no centro. Esse grupo fosfato, quando adicionado à tirosina, desempenha um papel fundamental na ativação e desativação de vias de sinalização intracelular, afetando diretamente o comportamento da célula. A fosforilação de resíduos de tirosina é altamente regulada e reversível, sendo tal interação entre substrato e enzima fundamental para o equilíbrio e a modulação das vias de sinalização, um fenômeno central na biologia celular e molecular.

**Tabela 1. Superfamília das proteínas tirosina fosfatases (PTPs): classes e seus respectivos substratos.**

CLASSE	MEMBROS	SUBSTRATO
	receptoras (21)	p-Tyr
	PTPs clássicos (38)	não receptoras ou citoplasmáticas (17)
		p-Tyr
<b>A) CLASSE I</b> mecanismo catalítico: resíduo de cisteína	PTPs com dupla especificidade (61)	MKPs (11) Atípicas (19) SSHs (3) PRLs (3) CDC14s (14) PTENs (5) Miotubulares (16)
		p-Tyr, p-Thr, p-Ser
<b>B) CLASSE II</b> mecanismo catalítico: resíduo de cisteína	LMWPTP (1)	
		p-Tyr
<b>C) CLASSE III</b> mecanismo catalítico: resíduo de cisteína	CDC25 (3)	CDC25A (1) CDC25B (1) CDC25C (1)
		p-Tyr, p-Thr
<b>D) CLASSE IV</b> mecanismo catalítico: resíduo aspartato	EyA (4)	
		p-Tyr, p-Ser

p-Tyr = fosfotirosina; p-Thr = fosfotreonina; p-Ser = fosfoserina; MKPs = proteínas quinases ativadas por mitógenos; SSHs = SSH1, SSH2 e SSH3; PRLs = PRL-1, PRL-2 e PRL-3. Adaptado de ALONSO et al., 2004.

### 1.2.3. CLASSE II - PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BAIXO PESO MOLECULAR (LMWPTP)

Dentre as quatro classes de PTPs, a que ganha destaque neste estudo é a classe II, compreendendo uma importante classe de enzima conhecida como LMWPTP (nos mamíferos). Na espécie humana, essa classe é codificada por um único gene: o *Acid Phosphatase 1* - *ACPI* (GENECARDS <https://www.genecards.org>), que se expressa em quatro diferentes isoformas, duas das quais são cataliticamente ativas (LMWPTP-A e LMWPTP-B) (HE et al., 2014).

Uma marcante característica que distingue a LMWPTP é o seu tamanho relativamente pequeno. A nomenclatura "de baixo peso molecular" faz referência à sua massa de 18 kDa; inferior às outras PTPs. Tais enzimas geralmente possuem uma estrutura compacta e, apesar de seu tamanho, desempenham uma relevante função na regulação das vias de sinalização celular. Elas possuem um domínio catalítico conservado, responsável pela remoção do grupo fosfato de resíduos de tirosina em proteínas-alvo, o que as tornam fundamentais para a

regulação das atividades celulares. A LMWPTP é, de fato, uma proteína multifuncional, sendo essencial na regulação de receptores do tipo tirosina quinase e nas vias de sinalização induzidas por fatores de crescimento, que controlam crescimento, diferenciação e adesão celular (ALONSO et al., 2004; HE et al., 2014). Desta forma, até recentemente, as LMWPTPs eram consideradas supressoras de tumores. No entanto, disfunção destas proteínas pode ter implicações significativas para o organismo. Por exemplo, alterações moleculares ou regulação inadequada da LMWPTP podem desencadear desregulações em vias de sinalização celular, contribuindo para o desenvolvimento de patologias incluindo o câncer. Sendo assim, a LMWPTP também pode ter ação como promotora de tumores, uma vez que exercem atividade de mediadores pertencentes a vias de sinalização relacionadas ao câncer. Neste contexto, diferentes grupos, reportaram que a LMWPTP apresenta um aumento significativo de sua expressão em células cancerígenas, resultando em efeitos oncogênicos que afetam a sobrevivência celular, a proliferação, a diferenciação e as respostas à morte celular. Para além, esta elevação em sua expressão se mostra um “marcador” preditivo de prognóstico desfavorável em amostras de tumores de mama, cólon, pulmão e neuroblastoma ao conferir as células cancerígenas resistência a fármacos (MALENTACCHI et al., 2005; FERREIRA et al., 2012; HOEKSTRA et al., 2015; RUELA-DE-SOUSA et al., 2016).

Além de seu papel na oncogênese, a LMWPTP também está intimamente relacionada ao metabolismo da glicose em tumores hematológicos e sólidos. Células exibindo altos níveis de LMWPTP tendem a ativar o chamado efeito Warburg, em parte, devido a uma modulação nas proteínas mitocondriais: PDH1, SDHA e VDAC, bem como da proteína transportadora de glicose 1 (GLUT-1) e da lactato desidrogenase (LDH). Essas modificações resultam em uma maior síntese de lactato, o que tem implicações significativas na progressão tumoral (FARIA et al., 2017, 2022a).

#### **1.2.4. CONTRIBUIÇÃO DO NOSSO GRUPO NO ENTENDIMENTO DO PAPEL DA LMWPTP NO CÂNCER**

A Figura 3 retrata os avanços no conhecimento sobre o papel das fosfatases na biologia celular, inicialmente no período entre 2001 e 2008, atenção foi dada às células normais (linfócitos, osteoblastos) e células leucêmicas ao investigar o impacto da modulação de fosfatases, através da inibição química ou gênica. Estes estudos forneceram fortes indícios sobre a ação pró-tumor da LMWPTP. Diante destes achados, iniciamos a fase de investir na validação

molecular da ação como promotora de tumor da LMWPTP, até então considerada como supressora tumoral.

Ao longo das últimas duas décadas, nossos estudos pioneiros têm destacado o papel relevante desempenhado pela LMWPTP na metástase, resistência a quimioterápicos e reprogramação do metabolismo energético (CLERICI et al., 2021; FARIA et al., 2017, 2021, 2022b; HOEKSTRA et al., 2015; RUELA-DE-SOUSA et al., 2016; SOUZA et al., 2009). Grande parte dos avanços se deu por análises em larga escala: transcriptômica, quinômica, proteômica e fosfoproteômica. Inicialmente, tais análises foram focadas em modelos de leucemia e permitiram a confecção de mapas integrados de vias de transdução de sinal predominantes, com consequente indicação de vias do metabolismo energético relevantes para o processo de resistência a quimioterápicos. Nesta fase, também foi desenvolvida a plataforma PepMatrix, que foi fundamental para a análise dos dados do quinoma (MILANI, 2010). Como desdobramento desta fase, diversos estudos dedicados ao aprofundamento no estudo das ômicas e de seus mecanismos moleculares foram delineados. A partir desses estudos, demosramos de forma pioneira o papel significativo da LMWPTP na metástase, resistência e promoção do efeito Warburg, conforme documentado por FARIA e colaboradores (2017), HOEKSTRA e colaboradores (2015), RUELA-DE-SOUSA e colaboradores (2016) e SOUZA e colaboradores (2009). Em particular, no contexto do CRC, no presente estudo nossa atenção concentrou-se nas linhagens celulares HCT116 e HT29 (*KRAS* e *BRAF*, respectivamente) devido a HT29 apresentar expressão elevada da LMWPTP e perfil metabólico glicolítico (CLERICI et al., 2021). Essas características, em linhas gerais, sugerem uma menor sensibilidade à ação de agentes citotóxicos (dados ainda não publicados).



**Figura 3. Publicações do nosso grupo de pesquisa sobre a LMWPTP em diferentes tipos de cânceres.** Nosso grupo foi um dos primeiros a reportar a relevância da LMWPTP para o processo de resistência a fármacos. Com base nesses achados, ampliamos a investigação para o processo metastático, bem como para diferentes cânceres. \*Precusores do presente estudo.

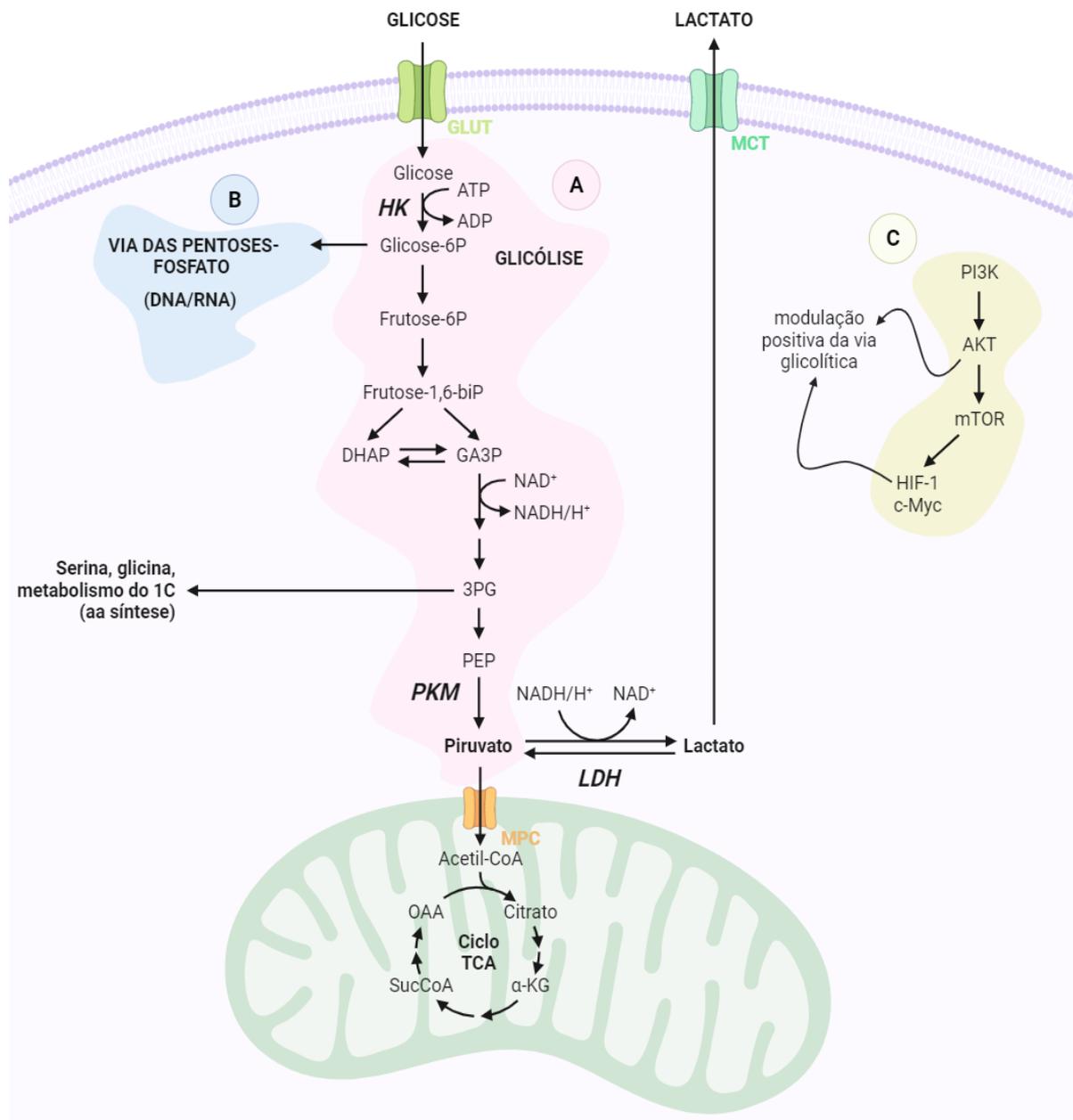
### 1.3. REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA E O EFEITO WARBURG

Para sustentar a alta taxa de proliferação ininterrupta e desregulada (HAUSMAN, 2019) as células cancerígenas realizam uma reprogramação de seu metabolismo energético, direcionando-as para a manutenção do ciclo patológico (YANG et al., 2019). Essa reprogramação abrange várias facetas cruciais: (1) há um aumento significativo na captação de glicose, que serve como a sua principal fonte de energia; (2) ocorrem alterações na expressão e/ou atividade de enzimas tanto citoplasmáticas quanto mitocondriais; e, conseqüentemente, (3)

resulta no aumento na síntese de lactato, decorrente da ação da piruvato desidrogenase (WARBURG, 1925).

Em condições de oferta adequada de oxigênio, as células efetuam a metabolização da glicose a gás carbônico e água por meio de processos como a via glicolítica, o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória, gerando eficientemente ATP através da fosforilação oxidativa (Figura 4A). No entanto, em baixa disponibilidade de oxigênio (hipoxia) as células adotam uma rota alternativa, metabolizando a glicose em lactato no processo de fermentação. Em 1956, Warburg elucidou o mecanismo do metabolismo energético das células cancerígenas que constituem os tumores, ao descrever que mesmo na presença de oxigênio, essas células continuavam a metabolizar a glicose em lactato similar a condição de hipoxia, o qual Warburg reconheceu como "fermentação aeróbica" ou "glicólise aeróbica" (WARBURG, 1956). Warburg acreditava que essa reprogramação metabólica estava ligada a deficiência mitocondrial e, por conseguinte, a uma disfunção na respiração celular, ou seja, na fosforilação oxidativa (WARBURG, 1956). Atualmente, sabe-se que a glicólise aeróbica ocorre mesmo com mitocôndrias funcionais, mudando a concepção inicial de Warburg e destacando a complexidade do metabolismo nas células cancerígenas (LIBERTI; LOCASALE, 2016).

Apesar de menos eficiente em termos de produção da molécula de ATP quando comparada à fosforilação oxidativa: 36 moléculas de ATP/glicose oxidada (perfil oxidativo), enquanto a glicólise aeróbica (perfil glicolítico – efeito Warburg) produz apenas 2 moléculas de ATP (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009), esta confere vantagens evolutivas às células cancerígenas como a geração do ATP de forma mais rápida, permitindo uma resposta ágil às restrições de nutrientes e demandas energéticas; desvio de metabólitos para biossíntese de moléculas essenciais para a proliferação celular, tais como nucleotídeos (DNA e RNA), lipídios e proteínas;; e acidificação extracelular causada pelo lactato transportado para o meio extracelular exerce um diminui o pH extracelular e afetando a matriz extracelular. Esse fenômeno facilita a migração das células cancerígenas para sítios secundários, destacando a interação entre o metabolismo celular e a capacidade invasiva das células cancerígenas em seu microambiente (Figura 4B, C) (LIBERTI; LOCASALE, 2016).



**Figura 4. Metabolismo da glicose e o efeito Warburg.** (A) O metabolismo da glicose em células cancerígenas é notável pela prevalência da conversão de piruvato em lactato. A glicose que é incorporada nas células é convertida em Glicose-6P pela ação da enzima HK. Essa glicose fosforilada pode seguir dois principais caminhos: a glicólise e a (B) via das pentoses-fosfato, dependendo das condições metabólicas da célula. Em células cancerígenas com fenótipo glicolítico, ambas prevalecem. O PEP é, então, convertido a piruvato através da catalise da PKM e o piruvato é convertido em lactato graças à ação da enzima LDH. Enquanto isso, a via das pentoses-fosfato contribui para a formação de intermediários biossintéticos, como nucleotídeos e NADPH. Além disso, a ativação da via PI3K/AKT/mTOR estimula a via glicolítica, bem como a ativação de fatores de transcrição, incluindo HIF-1 $\alpha$ . O fator de transcrição *c-Myc*, associado a HIF-1 $\alpha$ , também desempenha um papel na promoção da via glicolítica, influenciando positivamente a expressão das enzimas envolvidas (C). \*Nota: Glicose-6P = Glicose-6 fosfato; PEP = Fosfoenolpiruvato; via PI3K (Fosfatidilinositol 3-quinase) / AKT (Proteína quinase B) / mTOR (proteína quinase); = HIF-1 $\alpha$  = Fator Induzível por Hipóxia-1 alfa. Adaptado de FÁRIA, 2016. Ilustração realizada com a ferramenta BioRender.

Alterações na expressão e/ou atividade de determinadas enzimas, tais como Hexoquinase Isoforma 2 (HK2), Piruvato Quinase Isoforma M2 (PKM2) e Lactato Desidrogenase (LDH) desempenham papéis fundamentais nessa reprogramação metabólica, permitindo uma reprogramação direcionada para o aumento da captação de glicose e da síntese de lactato, aspectos centrais do "efeito Warburg" (WARBURG, 1956). Agora, ao explorar mais detalhadamente a influência dessas proteínas no contexto do metabolismo, podemos compreender melhor como elas contribuem para a manutenção do ciclo patológico:

• **Hexoquinase (HK)** catalisa a primeira reação da via glicolítica, convertendo glicose e ATP em glicose-6 fosfato e ADP (Reação 1) (MAZURE, 2017). Há a associação entre a expressão elevada de HK2 e um índice de baixa sobrevivência dos pacientes em diferentes tipos tumorais, incluindo câncer colorretal, mama, câncer gástrico, linfoma não Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo e carcinoma hepatocelular.

**Reação 1**



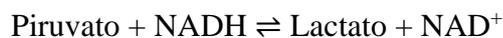
• **Piruvato Quinase (PK)** catalisa a última etapa da glicólise, transferindo fosfato do fosfoenolpiruvato para ADP, gerando ATP e piruvato (Reação 2). Expressa em muitas células, é geralmente encontrada como monômeros inativos ou como tetrâmeros ativos (LINCET; ICARD, 2015). No contexto do desenvolvimento tumoral, destaca-se a isoforma PKM2, cuja expressão e atividade contribuem para o efeito Warburg, promovendo o crescimento e suprimindo espécies reativas de oxigênio. Esta enzima facilita a produção de intermediários glicolíticos envolvidos na reprogramação metabólica da glicose, uma vez que os intermediários são transferidos para as vias da pentose, gerando NADPH para combater espécies reativas de oxigênio (ROS) e sintetizar nucleotídeos (TAMADA; SUEMATSU; SAYA, 2012). Há também indícios de que PKM2 atua como reguladora do HIF-1 $\alpha$ , contribuindo para a reprogramação do metabolismo celular (LUO; SEMENZA, 2012).

**Reação 2**



• **Lactato desidrogenase (LDH)** é uma enzima tetrâmera com duas isoformas, LDHA e LDHB, sendo a LDHA com alta afinidade pelo piruvato (URBAŃSKA; ORZECHOWSKI, 2019). Essa proteína desempenha um papel-chave na via glicolítica, catalisando a conversão do piruvato e NADH em lactato e NAD<sup>+</sup> (Reação 3) e em diversos tipos de câncer a expressão da LDHA é frequentemente elevada, contribuindo diretamente para efeito Warburg (URBAŃSKA; ORZECHOWSKI, 2019; ZHU et al., 2018). Em específico, a LDHA é regulada pelo fator de transcrição HIF-1, cuja ativação ocorre em condições de hipóxia aumentando a conversão do piruvato a lactato. O lactato é, então, transportado para o meio extracelular acidificando-o e facilitando a migração das células cancerígenas para sítios secundários (SPINICCI et al., 2022). (ZHU et al., 2018; URBAŃSKA; ORZECHOWSKI, 2019). Além disso, este metabólito desempenha um papel significativo na resistência à apoptose (*anoikis*), invasão e metástase (JIN et al., 2017).

### Reação 3



## 1.4. MITOXANTRONA

A quimioterapia, ao longo das décadas, tem sido uma abordagem crucial no tratamento do câncer, aliada à cirurgia e radioterapia (CHABNER; ROBERTS, 2005). No entanto, enfrenta desafios, como a falta de especificidade, rápida eliminação e baixa concentração dos quimioterápicos no ambiente tumoral (MOREIRA; DIAS; CORREIA, 2016). Além disso, as células cancerígenas podem desenvolver quimiorresistência, seja no início do tratamento ou após repetidas doses (HOUSMAN et al., 2014). Por isso, a comunidade científica e a indústria farmacêutica concentram esforços no desenvolvimento de terapias mais eficazes, destinadas a combater estes desafios (NERVI; DE MARINIS; CODACCI-PISANELLI, 2015; BARNES et al., 2017), explorando o reposicionamento de fármacos existentes bem como aprimorando seus protocolos de administração.

Neste contexto, a mitoxantrona (MTX) com sua estrutura molecular plana (Figura 5), destaca-se como uma candidata em potencial. Pertencente à família dos agentes antineoplásicos antraquinônicos, a MTX demonstra ação antiproliferativa nas células cancerígenas (EVISON et al., 2016). Devido a isso, é utilizada no tratamento de diversos tipos de cânceres, como mama

avanzado (LANDYS et al., 1985), linfoma não Hodgkin e câncer de próstata resistente à terapia hormonal (MIMEAULT et al., 2007), leucemia mieloide aguda (EVISON et al., 2016) e até mesmo esclerose múltipla (SCOTT; FIGGITT, 2004).

Devido à sua estrutura molecular (Figura 5), possui a capacidade de intercalar-se entre os nucleotídeos da dupla fita de DNA (EVISON et al., 2016). Assim, seu mecanismo de ação concentra-se primordialmente no ciclo celular, sendo as células cancerígenas altamente proliferativas mais suscetíveis a indução de morte pela MTX. Essa susceptibilidade pode ser explicada pela elevada presença do complexo DNA-Topoisomerase II (TOPII)  $\alpha/\beta$  nessas células. A TOPII desempenha um crítico papel na regulação da topologia do DNA durante processos vitais, como replicação, transcrição e modulação cromossômica celular. Quando a MTX está presente no DNA, ela promove estabilização do complexo DNA- TOPII, ao inibir o religamento da dupla fita e resultando na clivagem permanente do DNA (EVISON et al., 2016).

Além disso, Toh e Li (2011) demonstraram um efeito inibitório significativo sobre HIF-1 $\alpha$  em condições de hipóxia em células cancerígenas de colorretal, HCT116 e 769-P. De forma surpreendente, essa inibição ocorreu independente da TOPII, pois o impacto na expressão de HIF-1 $\alpha$  permaneceu inalterado mesmo em células deficientes de tal enzima. Esse achado sugere que a MTX pode exercer também um efeito inibitório na síntese de HIF-1 $\alpha$ , uma vez que os níveis desse fator de transcrição diminuíram nas células tratadas (TOH; LI, 2011).

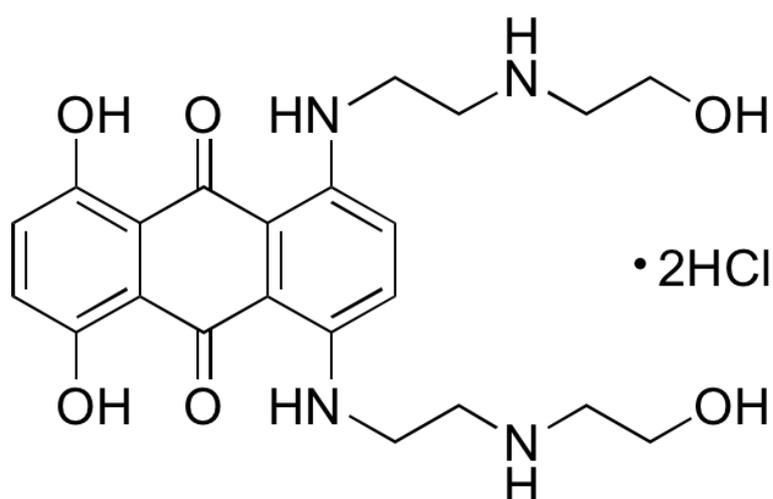


Figura 5. Estrutura molecular da mitoxantrona (MTX). Fórmula:  $C_{22}H_{28}N_4O_6$

Em um estudo conduzido por Mimeault e colaboradores (2007), a combinação da MTX com outros quimioterápicos como ciclopamina e gefitinib, demonstrou capacidade de bloquear diferentes fases do ciclo celular inibindo, assim, a proliferação celular e levando à morte das células cancerígenas da próstata. Além disso, a MTX, quando combinada com concentrações reduzidas de ciclopamina e gefitinib induziu alta taxa de apoptose devido à liberação mitocondrial do citocromo c, produção de peróxido de hidrogênio e ativação das caspases (MIMEAULT et al., 2007). Não obstante, em câncer colorretal, o tratamento com a MTX aumentou a infiltração de linfócitos T e inibiu o crescimento tumoral, especialmente nas metástases hepáticas. *In vitro*, as células cancerígenas do colorretal tratadas com MTX tiveram sua progressão de ciclo celular bloqueada, seguida de indução à apoptose. Quando essas células tratadas *in vitro* foram injetadas em modelos animais *in vivo*, houve um significativo aumento de linfócitos na região tumoral, resultando na redução do tamanho do tumor. Esse feito ocorreu devido a MTX promover a translocação da proteína calreticulina para a membrana celular crucial na resposta imunológica antitumoral (QIN et al., 2019).

### 1.5. MODELOS DE CULTURA 2D vs 3D

Até agora, as culturas de células 2D permanecem como métodos *in vitro* mais comumente usados para a triagem de novos compostos. No entanto, esses modelos são incapazes de reproduzir as propriedades dos tumores sólidos *in vivo*, bem como a sua resistência à terapêutica (NIU; WANG, 2015; CHATZINIKOLAIDOU, 2016). Consequentemente, na maioria das vezes, um número expressivo de candidatos a fármacos acaba prosseguindo para os ensaios *in vivo*, e se mostram ineficazes, o que contribui para o uso excessivo de animais em experimentação, bem como aumento do tempo e do custo geral do processo de descoberta de fármacos (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; MENSHYKAU, 2017). Neste sentido, modelos aprimorados *in vitro*, capazes de mimetizar as características dos tumores humanos *in vivo*, têm sido propostos (CHATZINIKOLAIDOU, 2016; MENSHYKAU, 2017).

Desta forma, uma vez que muitas linhagens apresentam alterações genéticas e epigenéticas que também são encontradas em biópsias do tecido tumoral correspondente (JONES et al., 2008), ao longo das últimas décadas, tem surgido modelos alternativos de cultura de células em 3D. Estes modelos mimetizam a biologia do tumor *in vivo*, o microambiente, condições de crescimento das células tumorais, as interações célula-célula e célula-matriz, além de apresentarem zonas (áreas) contendo gradiente de concentração de nutrientes e (CHEEMA;

LOIZIDOU, 2011; LU; WEAVER; WERB, 2012; NYGA; WARE et al., 2016; LEE; BISSELL, 2018) Portanto, modelos 3D têm servido para descoberta e validação da atividade farmacológica e toxicidade de candidatos a fármacos (CHATZINIKOLAIDOU, 2016; VINCI et al., 2012).

Esferoides grandes (>500 $\mu$ m de diâmetro) são capazes de mimetizar propriedades de tumores sólidos humanos (NATH; DEVI, 2016). Essas propriedades influenciam o efeito terapêutico de vários fármacos nos esferoides, 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:

• **Hipóxia:** nos tumores sólidos, o fornecimento de oxigênio para as células presentes nas regiões internas da massa tumoral é frequentemente reduzido, devido ao aumento da distância entre a vasculatura e as células (HÖCKEL; VAUPEL, 2001). Além disso, várias irregularidades dos vasos sanguíneos tumorais (paredes anormais, arquitetura ou densidade vascular anormal) também contribuem para o acesso limitado ao oxigênio, pelas células (HÖCKEL; VAUPEL, 2001). Isso leva ao estabelecimento de um gradiente de oxigênio, ou seja, as células da camada externa do tumor têm alto acesso ao oxigênio, enquanto as camadas internas (~100  $\mu$ m dos vasos tumorais) estão em hipóxia (HÖCKEL; VAUPEL, 2001). Durante o crescimento dos esferoides, também é estabelecido um gradiente de oxigênio (GRIMES; FLETCHER; PARTRIDGE, 2014). A difusão de oxigênio nos esferoides geralmente resulta em um gradiente de concentração de oxigênio do exterior para o interior do esferoide o qual é explicado pela proliferação das células. À medida que o esferoide cresce, a demanda metabólica das células na região central aumenta, levando a uma diminuição da concentração de oxigênio nessa região. Isso pode criar um gradiente de oxigênio, onde as células na periferia do esferoide têm acesso a níveis mais elevados de oxigênio do que as células no centro. Esse gradiente de oxigênio pode influenciar a proliferação celular, a apoptose e a resposta a tratamentos, como terapias anticancerígenas (ROHWER; CRAMER, 2011; GRIMES; FLETCHER; PARTRIDGE, 2014).

• **Reprogramação do metabolismo energético:** sob condições normais de oxigênio, as células obtêm sua energia através da fosforilação oxidativa mitocondrial. Em tumores sólidos, devido ao reduzido conteúdo de oxigênio disponível nas regiões internas do tecido, as células obtêm energia através do metabolismo anaeróbico da glicose, que tem o lactato como subproduto (HIRSCHHAEUSER; SATTLER; MUELLER-KLIESER, 2011). Esse metabolismo energético alterado apresentado pelos tumores sólidos humanos também é encontrado nos esferoides tumorais (LONGATI et al., 2013). O ambiente hipóxico encontrado

nos esferoides também pode contribuir para o desenvolvimento da resistência das células tumorais à terapêutica, devido ao fato de que alguns compostos (por exemplo, 5-fluorouracil, cisplatina, doxorubicina e irinotecano) precisam de oxigênio para induzir um efetivo efeito anticâncer, através da formação de espécies reativas de oxigênio, que danificam componentes celulares como membrana, e macromoléculas (DNA, lipídeo e proteínas) (DEAVALL et al., 2012; WIGERUP; PÅHLMAN; BEXELL, 2016).

• **Acidificação do microambiente:** em tumores sólidos humanos, o aumento da produção de lactato por células privadas de oxigênio origina um ambiente ácido (pH de 6,5-7,2) (TRÉDAN et al., 2007). Nos esferoides, a produção de lactato também promove a acidificação de seu núcleo (HIRSCHHAEUSER; SATTLER; MUELLER-KLIESER, 2011). Esses baixos valores de pH têm impacto na eficiência dos medicamentos, afetando sua captação pelas células (MEHTA et al., 2012).

## 1.6. CÂNCER GASTROINTESTINAL

O termo câncer gastrointestinal (GI) engloba diversas categorias de câncer que acometem o trato gastrointestinal e seus órgãos acessórios no papel de digestão, incluindo: vesícula biliar e pâncreas (POURHOSEINGHOLI; VAHEDI; BAGHESTANI, 2015). Os cânceres que abrangem o GI apresentam lesões displásicas benignas, as quais progridem até lesões malignas e, culminam no câncer. Diversos aspectos como fatores genéticos e ambientais não hereditários, como hábitos de vida e dieta, influenciam na patogênese e fisiopatologia dos cânceres GIs específicos (KATONA; LYNCH, 2018).

O câncer GI representa uma das neoplasias malignas mais prevalentes em países ocidentais e asiáticos, em detrimento de suas condições econômicas e culturais que se tornam fatores de risco neste contexto. Expressando uma das principais causas de mortalidade relacionada ao câncer e continua sendo um grande desafio no campo do tratamento oncológico. O diagnóstico precoce de metástases é essencial para uma medicina de precisão personalizada, viabilizando a distinção e melhor aplicabilidade entre uma abordagem invasiva (cirurgia radical), ou passiva (terapias adjuvantes). Apesar dos avanços em técnicas cirúrgicas e quimiorradioterapia, a taxa de sobrevida global em pacientes com câncer GI avançado permanece inferior a 15%, devido à rápida progressão patológica, disseminação metastática e resistência a tratamentos (WANG et al., 2021).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 2004.
- ALZHRANI, S. M.; AL DOGHAITHER, H. A.; AL-GHAFAR, A. B. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (review). *Molecular and Clinical Oncology*, v. 15, n. 6, 2021.
- AOYAMA, H. et al. Proteínas tirosina fosfatases: Propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, 2003.
- BARNES, T. A. et al. Efficacy, safety, tolerability and price of newly approved drugs in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*, 2017.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2013.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2005.
- CHATZINIKOLAIDOU, M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug Discovery Today*, 2016.
- CHENG, H. C. et al. Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme Research*, 2011.
- CHIAL, B. H. et al. Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. *Nature Education*, v. 1, n. 2008, 2008.
- CUKIERMAN, E. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, v. 294, n. 5547, p. 1708–1712, 23 nov. 2001.
- DEAVALL, D. G. et al. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology*, 2012.
- EVISON, B. J. et al. Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison. *Medicinal research reviews*, v. 36, n. 2, p. 248–99, mar. 2016.
- FARIA, A. V. S. et al. Oncophosphosignaling Favors a Glycolytic Phenotype in Human Drug Resistant Leukemia. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 118, n. 11, p. 3846–3854, nov. 2017.
- FARIA, A. V. S. et al. Platelet-dependent signaling and Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase expression promote aggressive phenotypic changes in gastrointestinal cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1868, n. 1, 2022.
- FERREIRA, P. A. et al. Knocking Down Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase (LMW-PTP) Reverts Chemoresistance through Inactivation of Src and Bcr-Abl Proteins. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.
- GRIMES, D. R.; FLETCHER, A. G.; PARTRIDGE, M. Oxygen consumption dynamics in steady-state tumour models. *Royal Society Open Science*, v. 1, n. 1, 2014.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000.

HARVEY, A. J. Overview of Cell Signaling Pathways in Cancer. Em: Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine. [s.l: s.n.].

HAUSMAN, D. M. What is cancer? Perspectives in Biology and Medicine, v. 62, n. 4, 2019.

HE, R. J. et al. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica* 2014 35:10, v. 35, n. 10, p. 1227–1246, 15 set. 2014.

HIRSCHHAEUSER, F.; SATTLER, U. G. A.; MUELLER-KLIESER, W. Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Research*, 2011.

HIRSCHHAEUSER, F.; SATTLER, U. G. A.; MUELLER-KLIESER, W. Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Research*, 2011.

HÖCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001.

HOEKSTRA, E. et al. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMWPTP) upregulation mediates malignant potential in colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 8300–8312, 2015.

HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*, 2014.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 1995.

JIN, L. et al. Phosphorylation-mediated activation of LDHA promotes cancer cell invasion and tumour metastasis. *Oncogene*, v. 36, n. 27, 2017.

JONES, S. et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 11, 2008.

KATONA, B. W.; LYNCH, J. P. Mechanisms of Gastrointestinal Malignancies. Em: Physiology of the Gastrointestinal Tract, Sixth Edition. [s.l: s.n.]. v. 2.

KOBAYASHI, H. et al. Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 16, n. 5, p. 282–295, 1 maio 2019.

KRASIN, M. J.; DAVIDOFF, A. M. Principles of Pediatric Oncology, Genetics of Cancer, and Radiation Therapy. Em: Pediatric Surgery: Sixth Edition. [s.l: s.n.]. v. 1–2.

LACZMANSKA, I.; SASIADEK, M. M. Tyrosine phosphatases as a superfamily of tumor suppressors in colorectal cancer. *Acta biochimica Polonica*, v. 58, n. 4, p. 467–70, 2011.

LANDYS, K. et al. Mitoxantrone as a first-line treatment of advanced breast cancer. *Investigational New Drugs*, v. 3, n. 2, 1985.

LEE, S.-Y.; BISSELL, M. A Functionally Robust Phenotypic Screen that Identifies Drug Resistance-associated Genes Using 3D Cell Culture. *BIO-PROTOCOL*, v. 8, n. 22, 2018.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, v. 41, n. 3, p. 211–218, mar. 2016.

LINCET, H.; ICARD, P. How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? *Oncogene*, 2015.

- LONGATI, P. et al. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer*, v. 13, 2013.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*, 2012.
- LUO, W.; SEMENZA, G. L. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, v. 23, n. 11, p. 560–6, nov. 2012.
- MALENTACCHI, F. et al. Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 334, n. 3, 2005.
- MAZURE, N. M. VDAC in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1858, n. 8, p. 665–673, 2017.
- MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, v. 164, n. 2, 2012.
- MENSHYKAU, D. Emerging technologies for prediction of drug candidate efficacy in the preclinical pipeline. *Drug Discovery Today*, 2017.
- MILANI, R.; FERREIRA, C. V.; GRANJEIRO, J. M.; PAREDES-GAMERO, E. J.; SILVA, R. A.; JUSTO, G. Z.; NADER, H. B.; GALEMBECK, E.; PEPPELENBOSCH, M. P.; AOYAMA, H.; ZAMBUZZI, W. F. Phosphoproteome Reveals an Atlas of Protein Signaling Networks During Osteoblast Adhesion. *Journal of Cellular Biochemistry (Print)*, v. 109, p. 957-966, 2010.
- MIMEAULT, M. et al. Improvement of cytotoxic effects induced by mitoxantrone on hormone-refractory metastatic prostate cancer cells by co-targeting epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling cascades. *Growth Factors*, v. 25, n. 6, 2007.
- MOREIRA, A. F.; DIAS, D. R.; CORREIA, I. J. Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2016.
- NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics*, 2016.
- NERVI, C.; DE MARINIS, E.; CODACCI-PISANELLI, G. Epigenetic treatment of solid tumours: A review of clinical trials. *Clinical Epigenetics*, 2015.
- NIU, N.; WANG, L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics*, 2015.
- NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 5, n. 3, p. 239–248, 16 ago. 2011.
- OKI, E. et al. 6 Circulating Cancer Cells. *Em: Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas*. [s.l.: s.n.]. v. 4.
- PADUCH, R. Theories of cancer origin. *European Journal of Cancer Prevention*, v. 24, n. 1, p. 57–67, jan. 2015.
- PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007.

POURHOSEINGHOLI, M. A.; VAHEDI, M.; BAGHESTANI, A. R. Burden of gastrointestinal cancer in Asia; an overview. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 2015.

QIN, J. et al. Vaccination with mitoxantrone-treated primary colon cancer cells enhances tumor-infiltrating lymphocytes and clinical responses in colorectal liver metastases. *Journal of Surgical Research*, v. 233, p. 57–64, 2019.

ROHWER, N.; CRAMER, T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resistance Updates*, v. 14, n. 3, 2011.

RUELA-DE-SOUSA, R. R. et al. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase predicts prostate cancer outcome by increasing the metastatic potential. *European Urology*, 2016.

SCOTT, L. J.; FIGGITT, D. P. Mitoxantrone: A review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs*, 2004.

SEMENZA, G. L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Journal*, 2007.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

TAMADA, M.; SUEMATSU, M.; SAYA, H. Pyruvate kinase M2: Multiple faces for conferring benefits on cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 2012.

TOH, Y. M.; LI, T. K. Mitoxantrone inhibits HIF-1 $\alpha$  expression in a topoisomerase II-independent pathway. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 15, p. 5026–5037, 2011.

TOMMELEIN, J. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Connect Metastasis-Promoting Communication in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 5, n. March, p. 1–11, 2015.

TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006.

TRÉDAN, O. et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007.

URBAŃSKA, K.; ORZECZOWSKI, A. Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.

WANG, D. K. et al. Targeted Immunotherapies in Gastrointestinal Cancer: From Molecular Mechanisms to Implications. *Frontiers in Immunology*, 2021.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956.

WARBURG, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*, v. 9, n. 1, p. 148–163, 1 mar. 1925.

WARE, M. J. et al. Generation of an in vitro 3D PDAC stroma rich spheroid model. *Biomaterials*, v. 108, 2016.

WIGERUP, C.; PÅHLMAN, S.; BEXELL, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 2016.

YANG, H. et al. Review roles of GLUT-1 and HK-II expression in the biological behavior of head and neck cancer. *Oncotarget*, v. 10, n. 32, p. 3066–3083, 2019.

ZHU, W. et al. The molecular mechanism and clinical significance of LDHA in HER2-mediated progression of gastric cancer. *American Journal of Translational Research*, v. 10, n. 7, 2018.

ZIPS, D.; THAMES, H. D.; BAUMANN, M. New anticancer agents: In vitro and in vivo evaluation. *In Vivo*, 2005.

## CAPÍTULO 2: CÂNCER DE COLORRETAL

---

### RESUMO

O câncer colorretal é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sendo a metástase e a resistência ao tratamento quimioterápico as principais causas da elevada taxa de mortalidade desse tipo de câncer. Demonstramos que a superexpressão da Proteína Tirosina Fosfatase de Baixa Massa Molecular (LMWPTP) em câncer colorretal está correlacionada a um maior potencial de ocorrência de metástase no fígado, parcialmente devido à reprogramação do metabolismo da glicose. Com base nisso, nosso grupo está interessado em identificar pequenas moléculas com potencial para diminuir a quantidade ou a atividade da LMWPTP. Nesse sentido, embora a mitoxantrona tenha ação anticancerígena, pouco se sabe sobre a ação molecular por trás dessa propriedade. Portanto, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito da mitoxantrona sobre alterações na quantidade de LMWPTP e enzimas glicolíticas em células in vitro de câncer colorretal (HT29 e HT116) em modelos de cultura celular 2D e 3D. O tratamento reduz a quantidade de LMWPTP, além das atividades da lactato desidrogenase e piruvato quinase. Curiosamente, por meio de um procedimento extenso de acoplamento rígido, com estudo de docagem molecular foram previstas diferentes interações MTX-LMWPTP nos sítios ativos e regulatórios da enzima. Esses dados abrem novos caminhos na compreensão da biologia celular tumoral e criam oportunidades para novos alvos terapêuticos.

**Palavras-chave:** LMWPTP; Câncer colorretal; Efeito Warburg; Mitoxantrona.

## ABSTRACT

Colorectal cancer is the second leading cause of death worldwide, with metastasis and resistance to chemotherapy being the main reasons for its high mortality rate. We have demonstrated that the overexpression of Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase (LMWPTP) in colorectal cancer is correlated with a higher potential for liver metastasis, partially due to glucose metabolism reprogramming. Based on this, our group is interested in identifying small molecules with the potential to decrease the quantity or activity of LMWPTP. In this regard, although mitoxantrone has anticancer action, little is known about the molecular action behind this property. Therefore, the present study aimed to analyze the effect of mitoxantrone on changes in the quantity of LMWPTP and glycolytic enzymes in colorectal cancer cells (HT29 and HT116) in 2D and 3D cell culture models. The treatment reduces the quantity of LMWPTP, as well as the activities of lactate dehydrogenase and pyruvate kinase. Interestingly, through an extensive rigid coupling procedure, with a study of molecular docking, different MTX-LMWPTP interactions were predicted at the enzyme's active and regulatory sites. These data open up new avenues in understanding tumor cell biology and create opportunities for new therapeutic targets.

**Keywords:** LMWPTP; Colorectal cancer; Warburg effect; Mitoxantrone.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CÂNCER COLORRETAL

O intestino grosso é o último órgão do trato gastrointestinal, sendo composto por quatro regiões anatômicas: ceco, cólon, reto e ânus. O ceco, demarca a primeira seção, não participando de quaisquer processos digestivos. Em seguida, o cólon é subdividido em quatro regiões (ascendente, transverso, descendente e sigmoide), executando a reabsorção de água e minerais. Por fim, os últimos centímetros do intestino grosso compreendem o reto e o canal anal, os quais, respectivamente, formam e eliminam das fezes. Histologicamente, o tecido do intestino grosso contém quatro camadas, sendo as túnicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. No contexto do desenvolvimento do câncer de colorretal (CRC), a túnica mucosa possui um papel de destaque sendo composta pelas camadas lâmina própria, tecido conjuntivo frouxo e tecido muscular da mucosa. Neste sentido, dois dos principais tipos de cânceres são desenvolvidos a partir de dois tipos diferentes de células que formam o epitélio intestinal: (1) carcinoma, nas células absortivas (absorção de água) e (2) adenocarcinoma, caliciformes (secreção de muco) (ICHIMASA et al., 2022).

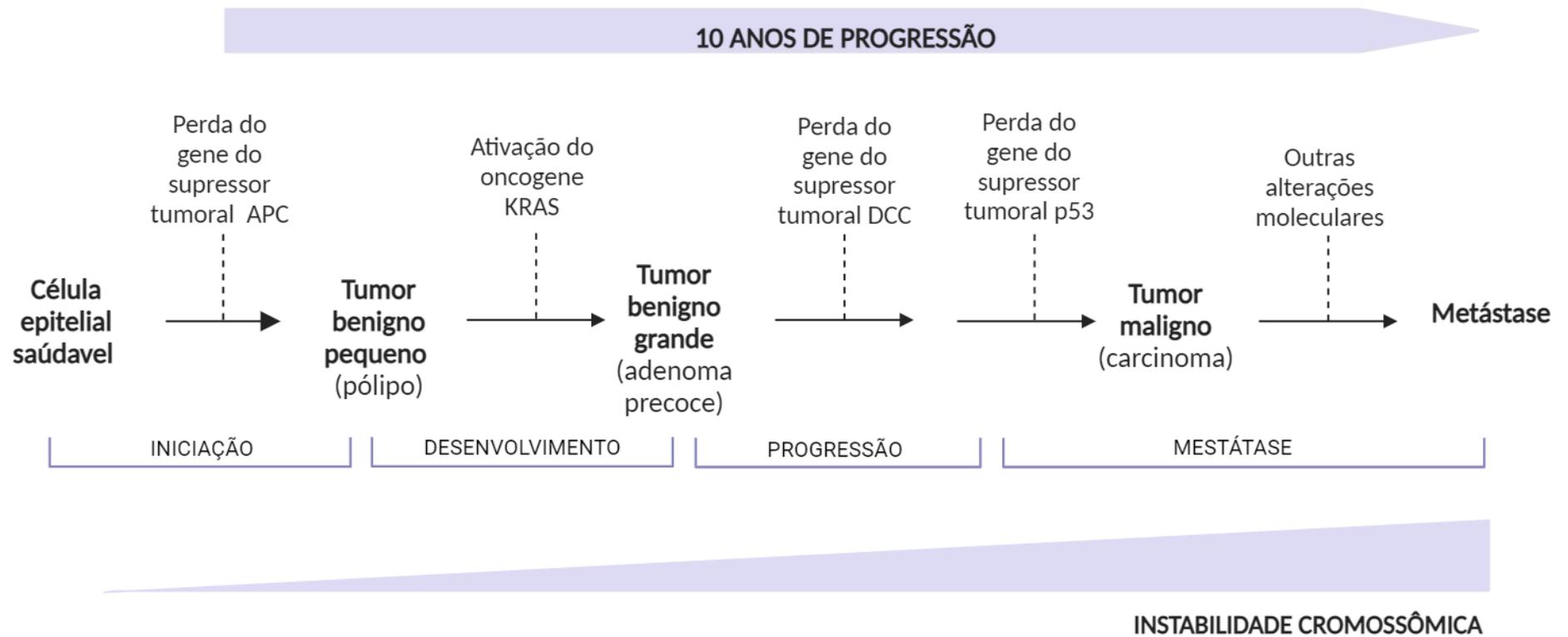
No CRC é observado um processo de proliferação celular ininterrupta e descontrolada, oriundo das células epiteliais pertencentes ao cólon e reto, resultado de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas. Dentre as alterações genéticas associadas ao CRC, destaca-se a ativação de oncogenes como *RAS*, *BRAF* e *PI3K*, e o silenciamento de supressores tumorais como *APC* e *P53* (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Vale ressaltar que tais alterações genéticas e epigenéticas conduzem as células epiteliais a esse fenótipo maligno, variando consideravelmente entre os pacientes, transformando o CRC em uma complexa afecção heterogênea, com distintos conjuntos de alterações (OGINO et al., 2011; BAHRAMI et al., 2018a, 2018b).

A maioria dos CRC são classificados como adenocarcinomas, derivados de células caliciformes produtoras de muco que revestem o tecido do cólon e do reto. Dito isto, existem outros tipos de cânceres que acometem a região colorretal, como: (1) tumores no estroma, que se formam em células especializadas do cólon conhecidas como células intersticiais de Cajal; (2) tumores carcinoides, que têm início em células intestinais produtoras de hormônios; (3) linfomas, que são cânceres do sistema imunológico formados no cólon ou reto; e (4) sarcomas, que normalmente têm origem nos vasos sanguíneos, mas ocasionalmente se formam nas paredes do cólon e/ou reto (MARLEY; NAN, 2016).

Os pólipos, proliferações celulares benignas, se desenvolvem na camada interna do tecido intestinal, onde, na premissa da ausência de sua identificação e remoção precoce, ocorre sua evolução e gênese do CRC (SOCIETY, 2014). Neste sentido, as alterações moleculares promovem eventos chave nesse processo, sendo consideradas precursoras da tumorigênese. Tal evolução ocorre gradualmente ao longo de diversos anos, conhecida como sequência adenoma-carcinoma (Figura 6).

## **1.2. FATORES DE RISCO**

As alterações dos pólipos são altamente heterogêneas, resultando em diferentes graus de progressão e severidade, de acordo com o organismo de cada paciente. Assim, esta heterogeneidade é acompanhada de uma organização epistática, tendo como resultado o agrupamento das alterações moleculares em vias de sinalização relacionadas. A influência genética, incluindo síndromes gastrointestinais como a Síndrome de Lynch e a Polipose Adenomatosa Familiar, tem forte correlação com o risco de desenvolvimento do CRC, aumentando sua prevalência em 15-20% nos indivíduos com histórico familiar de câncer de primeiro grau. No entanto, a maioria dos casos resulta de fatores ambientais não hereditários, incluindo consumo excessivo de álcool, dieta rica em gordura animal, tabagismo, obesidade, sedentarismo, alto consumo de carne vermelha processada (JOHNSON et al., 2013; KUIPERS et al., 2015; MARLEY; NAN, 2016; SILVA; ERRANTE, 2017). Em adição, esses fatores podem perturbar a microbiota intestinal seja em sua diversidade e/ou proporção, o que contribui para o desenvolvimento do CRC (LIN et al., 2019).



**Figura 6. Progressão neoplásica seqüência adenoma-carcinoma.** Iniciando com uma lesão neoplásica, a saber: pólipos adenomatosos tubulares e tubulovilosos, além dos pólipos serrilhados sésseis, classificados em pólipos hiperplásicos, adenomas serrilhados sésseis e adenomas serrilhados tradicionais desenvolve-se para um adenoma precoce, progredindo posteriormente para um adenoma avançado. Durante esse processo, ocorrem alterações histológicas, mudanças epigenéticas e genéticas simultâneas conferindo o fenótipo maligno. Adaptado de OLIVEIRA, 2019. Ilustração realizada com a ferramenta *BioRender*.

### 1.3. EPIDEMIOLOGIA

Ocupando o terceiro lugar em incidência global e a segunda posição em termos de mortalidade (SUNG et al., 2021), o CRC, nas últimas quatro décadas passou por uma transformação epidemiológica notável, transicionando de uma condição considerada rara para assumir posições mais proeminentes nos índices de incidência e mortalidade. Esta significativa mudança está intrinsecamente associada ao envelhecimento populacional, aos hábitos alimentares e ao sedentarismo (TEIXEIRA et al., 2015; KUIPERS et al., 2015). Somente em 2020, mais de 1,8 milhões de novos casos de CRC foram diagnosticados, resultando em 915.880 mortes (Tabela 2), representando uma proporção significativa de um em cada 10 casos e mortes relacionadas a câncer. (SUNG et al., 2021). Prevê-se que a incidência desse câncer aumentará para 60% até 2030 embora tenha havido uma diminuição em sua ocorrência, possivelmente atribuída ao incremento nas práticas de rastreamento e ao aprimoramento das terapias disponíveis (ALZHRANI; AL DOGHAITHER; AL-GHAFAR, 2021).

Este cenário epidemiológico revela disparidades marcantes, evidenciando que o CRC tem uma incidência substancialmente mais elevada em países desenvolvidos devido ao estilo de vida, a exemplo da Austrália e de alguns países europeus, onde as taxas chegam a ser aproximadamente quatro vezes superiores aos demais países. Essa disparidade sugere uma interconexão complexa entre o desenvolvimento econômico e a incidência do CRC (BRENNER; CHEN, 2018). De fato, o CRC pode ser considerado um marcador de desenvolvimento socioeconômico. As variações de incidência observadas nos diversos continentes e países derivam da exposição da população a fatores de risco, destacando-se a complexidade na prevenção e detecção precoce desse câncer. Essa complexidade está intrinsecamente correlacionada ao desenvolvimento socioeconômico e ao acesso à assistência médica de qualidade (SUNG et al., 2021).

No Brasil, o CRC ocupa a terceira posição entre os tipos de câncer mais frequentes (INCA, 2023) com mais de 50 mil casos diagnosticados (Tabela 2) (GLOBOCAN, 2023). Para o triênio 2023-2025 são esperados 45.630 novos casos. No tocante à mortalidade, em 2020, ocorreram 20.245 de óbitos (INCA, 2023).

Tabela 2. Número estimado de novos casos e mortes em 2020 para câncer de cólon e reto, ambos os sexos, todas as idades.

<b>CÓLON</b>						
	<b>INCIDÊNCIA</b>			<b>MORTALIDADE</b>		
	<b>Ambos os sexos</b>	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	<b>Ambos os sexos</b>	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>
<b>Mundial</b>	1.096.601	600.896	547.616	576.858	302.117	274.741
<b>América do Sul</b>	59.557 (73%)	28.887 (73.4%)	30.670 (72.6%)	34.694 (72.5%)	17.216 (73.1%)	17.478 (72%)
<b>Brasil</b>	30.195 (50.7%)	14.619 (50.6%)	15.576 (50.8%)	16.240 (46.8%)	7.929 (46.1%)	8.311 (47.6%)
<b>RETO</b>						
	<b>INCIDÊNCIA</b>			<b>MORTALIDADE</b>		
	<b>Ambos os sexos</b>	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	<b>Ambos os sexos</b>	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>
<b>Mundial</b>	732.210	443.358	288.852	339.022	204.104	134.918
<b>América do Sul</b>	33.257 (81.5%)	17.840 (81%)	15.417 (82.1%)	113.086 (83.8%)	6.999 (83.4%)	6.087 (84.1%)
<b>Brasil</b>	22.064 (66.3%)	11.807 (66.2%)	10.257 (66.5%)	9.239 (70.6%)	4.959 (70.9%)	4.280 (70.3%)

Informações retiradas *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN): Cancer Today <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em 27 dez 2023.0

## 1.4. VIAS DE SINALIZAÇÃO ALTERADAS E ONCOGENES NO CÂNCER COLORRETAL

No CRC observa-se uma substancial heterogeneidade nas alterações moleculares específicas entre os tumores, embora tais alterações tendam a agrupar-se em conjuntos relacionados a epistasia (por exemplo, genes envolvidos em determinada via de sinalização) (KUIPERS et al., 2015). Genes, fatores de transcrição e vias de sinalização afetadas incluem as vias Wnt, Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR e *p53* (Tabela 3) (ALZHRANI; AL DOGHAITHER; AL-GHAFAR, 2021).

Tabela 3. Principais vias de sinalização sujeitas a mutações no câncer colorretal (CRC).

VIA DE SINALIZAÇÃO CELULAR	ALTERAÇÃO
Wnt	A desregulação na sinalização Wnt contribui para a proliferação celular interrompida e a formação de adenomas, precursores do CRC
Ras/Raf/MEK/ERK	Alterações no oncogene <i>KRAS</i> são comuns no CRC e resultam na ativação alterada da via Ras/Raf/MEK/ERK A hiperativação desta via promove a sobrevivência celular, proliferação e evasão da apoptose
PI3K/AKT/mTOR	Alterações em genes como <i>PIK3CA</i> e <i>PTEN</i> levam à desregulação da via PI3K/AKT/mTOR A ativação alterada desta via contribui para o aumento da sobrevivência celular, crescimento e resistência à apoptose
<i>TP53</i> (p53)	<i>TP53</i> (gene supressor de tumor) é frequentemente alterado no CRC A perda da função do p53 compromete o controle do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose, permitindo a sobrevivência e proliferação de células danificadas

## 2. JUSTIFICATIVA

Em cerca de 75% dos casos, o CRC se manifesta em estágios iniciais, localizando-se na mucosa (estágios 1 e 2) ou com disseminação restrita aos linfonodos regionais. Nesses estágios, a terapia combinada, compreendendo a intervenção cirúrgica para a remoção do tumor aliada à terapia quimioterápica, geralmente resulta em taxas expressivas de cura (MORÁN, 2010). No entanto, apesar dos notáveis progressos alcançados no tratamento, a letalidade associada ao CRC permanece consideravelmente elevada. Estimativas indicam que 15-20% dos casos evoluem para a formação de metástases, evidenciando a insuficiência das opções terapêuticas existentes. Nesses casos, a sobrevida em cinco anos é estimada em apenas 8-12% (HOWLADER et al., 2013). Diante desse contexto, impõe-se a necessidade premente de inovações terapêuticas que possam transpor as limitações atuais e, assim, conferir melhor prognóstico aos pacientes acometidos por esta neoplasia de alta letalidade.

Nosso grupo de pesquisa concentra-se de maneira dedicada na exploração de novas opções terapêuticas e vias relevantes para a agressividade tumoral e a resistência farmacológica. de modo particular, direcionamos nossa atenção para a correlação entre fosfatases e metabolismo energético. Demonstramos previamente que a LMWPTP desempenha um papel significativo no metabolismo da glicose em tumores hematológicos e sólidos (FARIA et al., 2017; FARIA et al., 2022). Especificamente, nossas observações indicam que células com níveis elevados de LMWPTP tendem a ativar o fenômeno de Warburg, em parte devido à regulação negativa de proteínas mitocondriais, além da regulação positiva de GLUT-1 e LDH. Isso, por conseguinte, contribui para a melhoria da síntese de lactato. Estes achados instigaram nossa investigação acerca do impacto da MTX na expressão de LMWPTP em células de câncer colorretal e, conseqüentemente, no metabolismo da glicolítico.

### 3. OBJETIVO

Este estudo teve como principal objetivo analisar os efeitos terapêuticos da MTX em duas linhagens de câncer de colorretal, HT29 e HCT116, com foco especial na via glicolítica (efeito Warburg) e nos níveis da LMWPTP.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Tabela 4. Hipóteses e objetivos acerca dos efeitos da MTX no câncer colorretal (CRC).**

HIPÓTESES	OBJETIVOS ESPECÍFICOS
<p><b>A.</b> A atividade antitumoral da MTX é mantida quando as células são cultivadas em estrutura 3D.</p>	<p><b>I.</b> Avaliar o efeito da MTX na morfologia dos esferoides constituídos de células HT29 e HCT116;</p> <p><b>II.</b> Avaliar o efeito da MTX na viabilidade das células presentes nos esferoides.</p>
<p><b>B.</b> Sob o ponto de vista molecular, a MTX é capaz de interferir no metabolismo da glicose.</p>	<p><b>I.</b> Avaliar se a expressão e/ou atividade de proteínas chaves para o processo Warburg são moduladas pela MTX.</p>
<p><b>C.</b> A mitoxantrona pode ter um impacto na atividade e/ou expressão LMWPTP em células de câncer colorretal</p>	<p><b>I.</b> Investigar se a exposição das células à MTX afeta a atividade e/ou expressão da LMWPTP.</p> <p><b>II.</b> Identificar possíveis sítios de ligação através da análise <i>in silico</i> (docagem molecular) da interação LMWPTP-MTX.</p>

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

#### 4.1.1. REAGENTES

Meio de cultura McCoy's 5A (Lonza, Walkersville MD, USA); sulfato de estreptomicina e penicilina foram obtidos da Nutricell (Campinas, SP, Brasil) e Soro Fetal Bovino (SFB) foi obtido da Gibco (Invitrogen, NY, USA). Reagentes para Western Blotting foram obtidos de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Membrana de PVDF foi obtida de Maine Manufacturing (Sanford, ME0473, USA). Anticorpos foram obtidos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), Santa Cruz (Dallas, Texas, USA) e Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). MTT (Brometo de [3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glicina, reagente de Bradford e albumina de soro bovino (BSA) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cloreto de sódio, TRIS e dodecilsulfato de sódio foram obtidos da Amresco (Solon, Ohio, EUA).

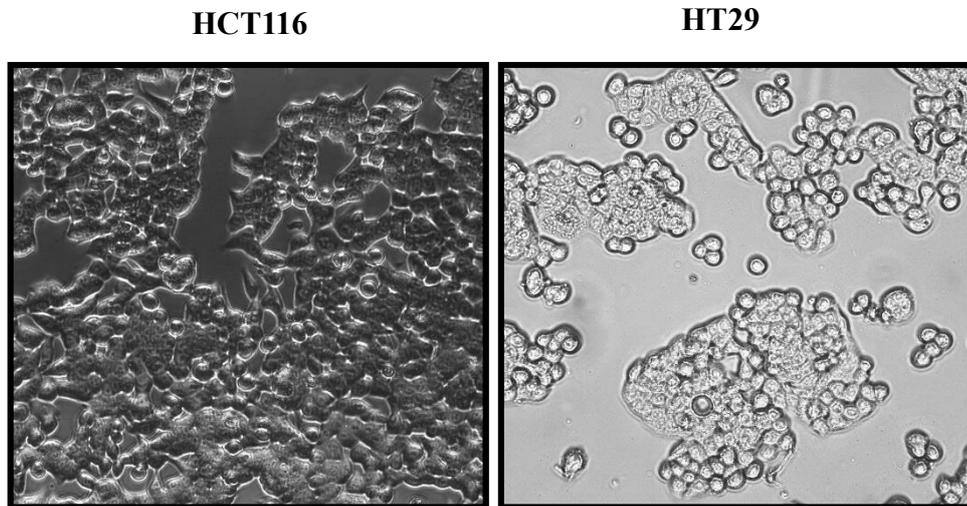
#### 4.1.2. LINHAGENS CELULARES

As linhagens de câncer colorretal (HCT116 e HT29) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil).

**Tabela 5. Linhagens celulares de câncer colorretal humano, suas características genéticas e origem.**

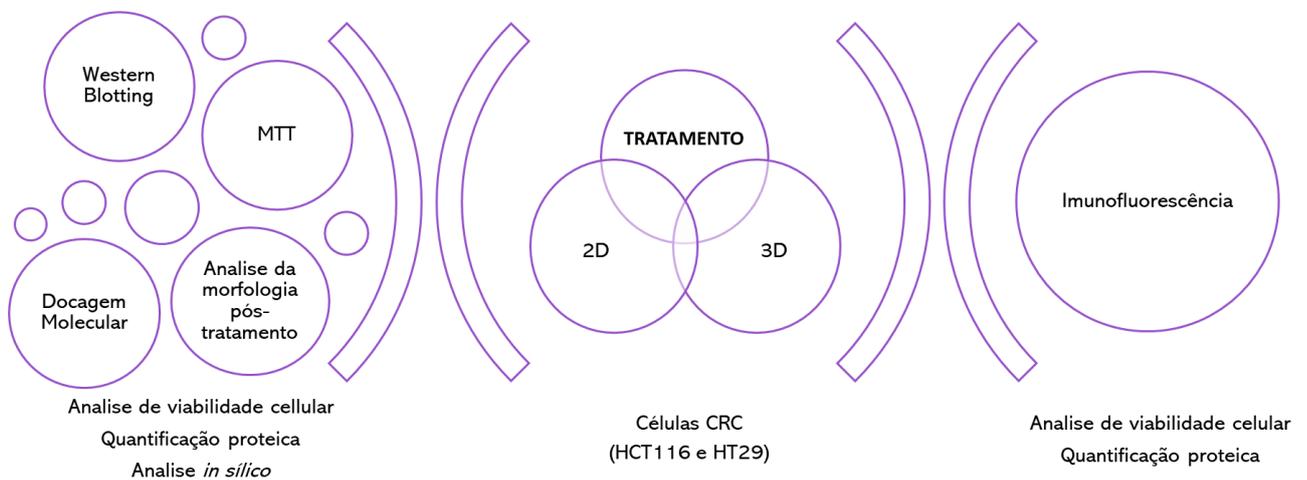
Linhagens	Genes Alterados	Paciente	Doença	Derivação
<b>HCT116</b>	<i>TGF1</i> e 2 positiva; <i>KRAS</i> (G13D); <i>PI3KCA</i> (H1047R)	Homem 48 anos	Carcinoma	Tumor primário
<b>HT29</b>	<i>BRAF</i> (V600E); <i>PI3K</i> (P449T); <i>p53</i> (R273H)	Mulher 44 anos	Adenocarcinoma	Tumor primário

(LIU; BODMER, 2006; GRIFFIN et al., 2011; AHMED et al., 2013; MOURADOV et al., 2014; OLIVEIRA, 2019)



**Figura 7. Imagens representativas das células de câncer de colorretal.** As imagens foram capturadas em campo claro e permitem observar as características morfológicas típicas das linhagens de CRC HCT116 e HT29 cultivadas em monocamada (2D). Imagens adquiridas através do LumaScope em aumento de 20x. Scale bar = 100 $\mu$ m

## 4.2. MÉTODOS



**Figura 8. Fluxograma da metodologia geral utilizada neste estudo.**

### 4.2.1. CULTURA CELULAR

As células de CRC foram cultivadas em meio McCoy's 5A contendo 100 U/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em atmosfera umidificada, 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### 4.2.2. ESFEROIDES

As células de CRC foram cultivadas em um ambiente tridimensional (3D) seguindo o protocolo previamente descrito por Souza e colaboradores (2010). De forma sucinta, as células HT29 e HCT116 ( $6 \times 10^4$  células/poço – 1mL) foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24h,  $6 \mu\text{L}$ /poço de *nanoshuttle* foi adicionado às células, seguida de incubação *overnight*. Estas células foram, então, tripsinizadas e semeadas ( $1 \times 10^4$  células/poço –  $100 \mu\text{L}$ ) em uma placa *cell-repellent* de 96 poços. Imediatamente depois, a placa de 96 poços foi colocada em um dispositivo magnético com 96 ímãs (*Nano3D Biosciences*) para atrair as células e formar o esferoide. Após 24h, o dispositivo magnético foi removido e os esferoides foram tratados com as concentrações 0, 5 e  $15 \mu\text{M}$  de MTX nos períodos de 24, 48 e 72h. As imagens foram capturadas pelo microscópio LumaScope (Etaluma Inc, Carlsbad, CA, EUA) com magnitude de 4x e analisadas pelo software Image J (NIH, EUA).

#### 4.2.3. IMUNOFLUORESCÊNCIA

**Viabilidade dos esferoides:** Posteriormente ao tratamento por 72h, o meio contendo o tratamento foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x. Foi utilizada uma solução de paraformaldeído a 4% –  $100 \mu\text{L}$  para a fixação das células, a qual foi incubada com as células por 20min. Em seguida, procedeu-se à marcação com Calceína-AM e Etídio homodímero-1 (kit Viabilidade/Citotoxicidade LIVE/DEAD™, Thermo Scientific) nas seguintes proporções:  $0,5 \mu\text{L}$  de calceína e  $2 \mu\text{L}$  de etídio/mL de PBS e  $0,5 \mu\text{L}$  de DAPI ( $2 \text{mg/mL}$ ). Por fim, as imagens foram adquiridas por meio de microscopia de imunofluorescência (LumaScope).

**Rastreamento de LMWPTP:** Pós-tratamento de 72h, as células foram fixadas (paraformaldeído a 4%), lavadas (1x com PBS) e permeabilizadas (Triton X-100 a 0,1% em PBS) por 10min. Posteriormente a permeabilização, foi realizada o bloqueio com BSA3%-Tween 0,1% diluído em PBS durante 1h, seguido pela incubação das células por 24h com anticorpo específico (LMWPTP anti-mouse). Na sequência, as células foram lavadas em TBS-Tween20 (0,05%) e novamente incubadas com anticorpo secundário, IgG Alexa Fluor (R) 488 – mouse. Finalmente, as imagens foram obtidas por meio do microscópio LumaScope.

Todas as imagens foram capturadas com magnitude de 10x.

#### **4.2.4. ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR PELA REDUÇÃO DO MTT**

As células HCT116 e HT29 ( $1,6 \times 10^4$  e  $1,8 \times 10^4$ /poço, respectivamente) foram cultivadas em placas de 96 poços. Após 24 horas, mitoxantrona foi administrada nas concentrações 0, 1, 2,5, 5, 10, 25 e 50 $\mu$ M e o tratamento mantido por 24h a 37°C, 85% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio de tratamento foi removido e as células incubadas com solução de MTT (0,5mg/mL em meio McCoy's livre de SFB) por 3h. Posteriormente, o MTT foi removido e, para dissolver os cristais de formazan produzidos – produto da redução do MTT por enzimas desidrogenases, principalmente mitocondriais –, adicionou-se 100 $\mu$ L de etanol, para melhor diluição a placa foi agitada por 10min. Após isso, a absorbância foi medida a  $\lambda = 570$ nm em um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, comparando as células tratadas com as células controle.

#### **4.2.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR *WESTERN BLOTTING***

As células HCT116 e HT29 foram cultivadas em placas de Petri na densidade de  $3,0 \times 10^6$  e  $3,6 \times 10^6$  células/placa, respectivamente. Após, as células foram tratadas com MTX pelo período de 24h nas concentrações de 5 e 10 $\mu$ M e, em seguida ao tratamento, foram lavadas com solução fisiológica, removidas das placas, transferidas para tubo falcon e centrifugadas (Hettich Universal 320R, HettichLab Technology) à 4.000rpm por 5 min na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foi realizado suspensão celular a qual foi centrifugada novamente resultando em pellet celular sendo lisado em gelo com o Tampão de Lise Celular RIPA. Posteriormente, as amostras foram segregadas através da centrifugação à 14.000rpm por 10min, e a concentração de proteínas nos lisados foi determinada pelo método de Bradford, conforme previamente descrito (BRADFORD, 1976). Em seguida, foi realizada a normalização e 30 $\mu$ g de proteínas foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e transferidos para membranas de PVDF (Maine Manufacturing). O bloqueio foi feito com BSA 3%, e as membranas foram incubadas a 4°C durante a noite com anticorpo primário (Tabela 6). Em sequência, as membranas foram lavadas em TBS-Tween20 (0,1%) e novamente incubadas com anticorpos secundários (Tabela 6) por 3h. A detecção das proteínas foi realizada utilizando

o sistema Alliance 6.7 UVITEC (Cambridge, UK) por meio da reação de quimiluminescência – (Laboratório Multiusuário do Instituto de Biologia, UNICAMP).

**Tabela 6. Anticorpos utilizados na quantificação de proteínas por *Western Blotting*.**

Anticorpo	Companhia	Código Numérico	Diluição
PKM2	Cell Signaling Technology	Glycolysis Kit – 8337T (D78A4) XP®	1:1000
p-PKM2 <sup>tyr105</sup>	Cell Signaling Technology	#3827S	1:1000
LDHA (C4B5)	Cell Signaling Technology	#3582S	1:1000
p-LDHA <sup>tyr10</sup>	Cell Signaling Technology	#8176S	1:1000
LMWPTP/ACP1	Santa Cruz Biotechnology	#A1413	1:1000
$\alpha$ -Tubulin	Cell Signaling Technology	#2144S	1:1000
Anti-Mouse	Cell Signaling Technology	#7076	1:1000
Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology	#7074	1:1000

PKM2 = pyruvate kinase 2; p-PKM2<sup>tyr105</sup> = phosphorylated pyruvate kinase 2 tyrosine 105 residue; LDHA = lactate dehydrogenase; p-LDHA<sup>tyr10</sup> = phosphorylated lactate dehydrogenase A tyrosine 10 residue.

#### 4.2.6. DOCAGEM MOLECULAR

Os estudos de docagem foram realizados com o software FRED (Fast Rigid Exhaustive Docking; versão 3.3.0.3 OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM) (MCGANN, 2011) com a função CHEMGAUSS4. As conformações estruturais da MTX foram preparadas utilizando os programas Makefraglib e OMEGA (OMEGA versão 3.1.0.3 OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM) (HAWKINS et al., 2010; HAWKINS; NICHOLLS, 2012). A estrutura cristalina da proteína-alvo LMWPTP de ID PDB 5KQG (LASKOWSKI, 2016) foi utilizada como receptor e preparada com o FRED\_Receptor utilizando o ligante 6VX como referência para determinar a localização do sítio ativo, conforme previamente relatado (FARIA, 2022). Uma docagem prévia foi feita com o ligante da estrutura cristalográfica a fim de validar os parâmetros utilizados (MCGANN et al., 2003; MCGANN, 2011). Ao final, uma análise visual foi feita para observação das interações entre o inibidor e as proteínas.

#### 4.2.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste T (bilateral, não pareado e score de erro de 0,05) e análise de variância de One-way ANOVA seguida pelo teste pós-hoc de Tukey com medida de erro padrão  $\pm$  e valor de  $p < 0,05$  foram realizados para a elaboração dos gráficos utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Mitoxantrona diminui a sobrevivência das células de câncer colorretal.

A MTX demonstrou efeito sobre as células de CRC em ambos os modelos 2D e 3D (Figuras 9 e 10). Para investigar se a MTX afeta as células de câncer colorretal, analisamos a viabilidade após o tratamento em diferentes concentrações (1, 2,5, 5, 10, 25 e 50 $\mu$ M). Observamos alterações no padrão de crescimento das células nos modelos 2D, tanto para a linhagem celular HT29 quanto para a HCT116, por meio da microscopia de contraste (Figura 9A).

Na linhagem HT29, a característica típica de formação de ilhotas, presente na condição de controle, foi gradualmente perdida ao longo do tratamento, com completa ausência dessa característica na concentração mais elevada (50 $\mu$ M). Similarmente, na linhagem HCT116, houve também a perda do crescimento típico: a organização celular caracterizada pelo contato célula-célula em toda a superfície, parcialmente ausente (Figura 9A).

Ainda, uma diminuição na capacidade de redução do MTT foi observada em ambas as linhagens, indicando, do ponto de vista metabólico, uma diminuição na viabilidade celular pela MTX. Assim, no cultivo 2D, HT29 e HCT116 demonstraram sensibilidade similar ao tratamento (Figura 9B).

Posteriormente, investigamos se os mesmos efeitos seriam mantidos em um modelo mais complexo, realizando o tratamento nos esferoides. Os esferoides derivados das células HT29 e HCT116 obtiveram um tratamento significativamente eficaz (Figura 1C)

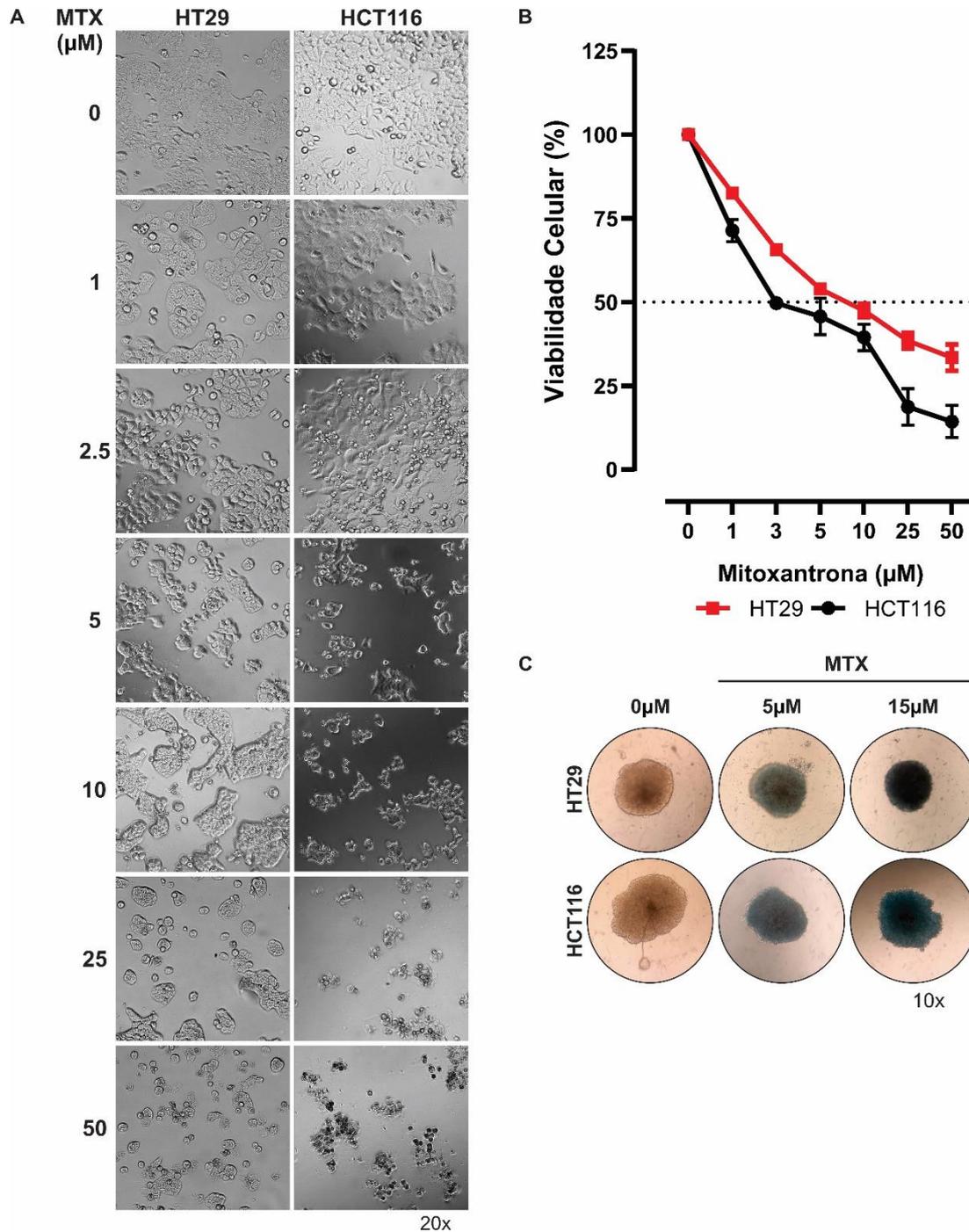
Curiosamente, apesar das condições de plaqueamento idênticas (densidade 2x10<sup>4</sup> células/poço) quando olhamos o controle, os esferoides derivados das células HT29 eram mais compactos em comparação com HCT116. os esferoides derivados das células HCT116 e HT29.

De forma intrigante, a MTX distribuiu-se uniformemente por toda a extensão do esferoide, o qual, é possível ver pela coloração azul (cor da MTX) nos esferoides tratados. Como mostrado na Figura 1C, houve uma diminuição no tamanho do esferoide em HCT116, enquanto em HT29 houve uma descompactação na estrutura esferoidal, indicado pelo seu “afrouxamento”.

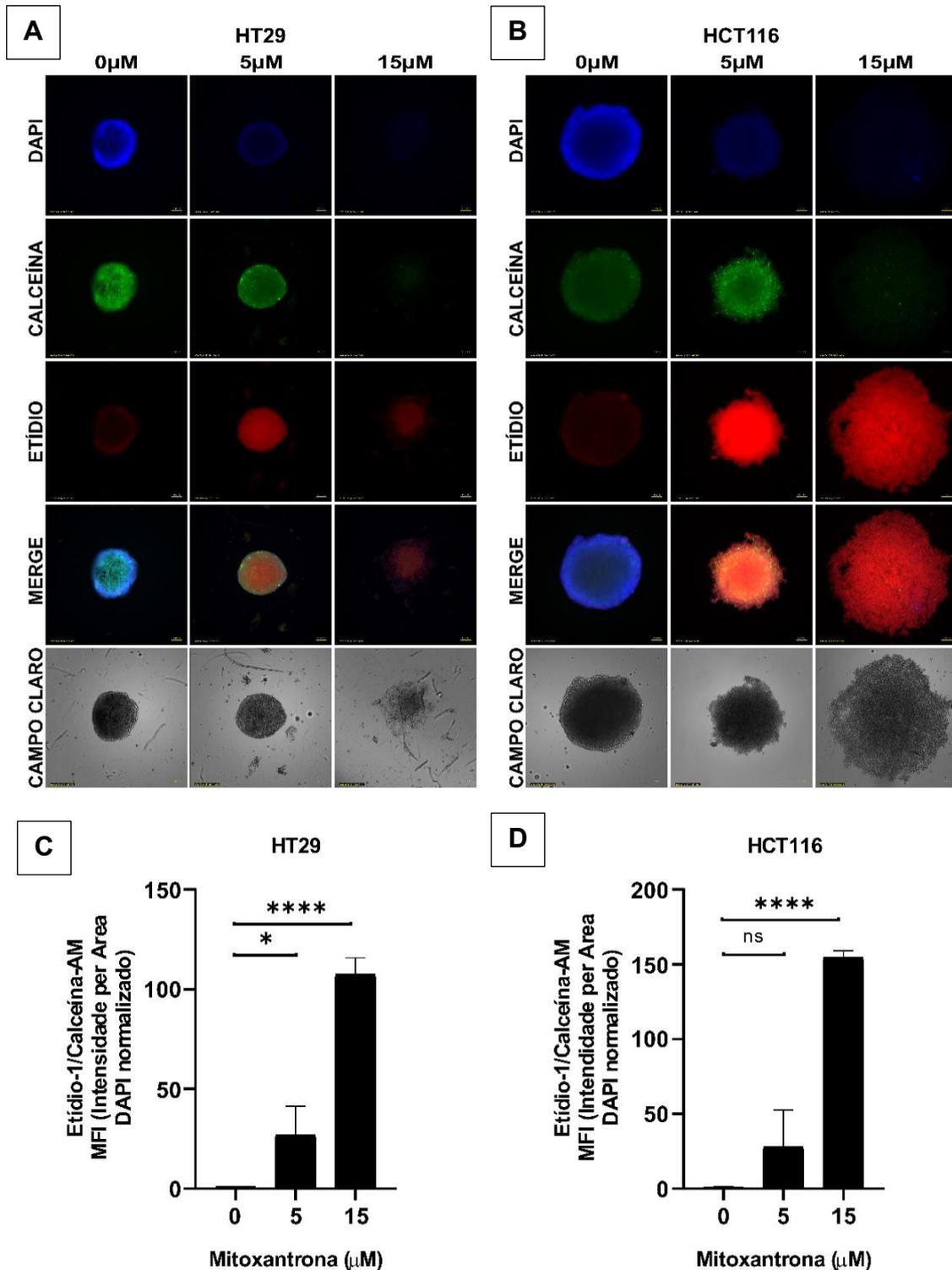
Esses achados foram confirmados utilizando imunofluorescência (Figura 10) através de marcadores que coram células viáveis (calceína) e não viáveis (homodímero de etídio) do *kit*

*Live/Dead*, avaliando a viabilidade celular pós-tratamento. Percebemos um aumento significativo na fluorescência do homodímero de etídio e uma diminuição na calceína nos esferoides (Figuras 10A, B). Além disso, através da razão etídio/calceína, constatamos um aumento expressivo da marcação com etídio na condição de tratamento 15 $\mu$ M comparado ao controle (Figuras 10C,D).

Portanto, esses resultados ressaltam a efetividade da MTX sobre as células CRC, tanto em modelo 2D quanto 3D, através da ação antiproliferativa e na viabilidade celular, além de sua capacidade de remodelar a arquitetura dos esferoides.



**Figura 9. Viabilidade das células de câncer de colorretal (CRC) expostas à mitoxantrona.** (A) A mitoxantrona diminui a proliferação das células de câncer colorretal. O tratamento foi realizado por 24h e, posteriormente, as imagens foram adquiridas através do LumaScope em aumento de 20x. Scale bar = 100 $\mu\text{m}$ ; (B) Efeito da mitoxantrona na viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT, HCT116  $\text{IC}_{50}$  = 2,166 e HT29  $\text{IC}_{50}$  = 2,478. A absorbância foi medida pelo leitor BioTek em  $\lambda$  = 570nm; (C) Influência da mitoxantrona sobre os esferoides de HCT116 e HT29. As imagens dos esferoides tratados foram obtidas em aumento de 10x após 24h. MTX = mitoxantrona. Scale bar = 100 $\mu\text{m}$ .



**Figura 10. A mitoxantrona induz a morte às células de câncer colorretal.** Esferoides derivados de HT29 (A) e HCT116 (B) células foram tratadas com mitoxantrona (5 e 15μM) e, posteriormente, sua viabilidade foi verificada por microscopia de fluorescência. A intensidade da fluorescência foi medida e apresentada nos gráficos C e D, conforme indicado na figura [ $*p = 0,0282$ ;  $****p = <0,0001$  (C) e ns (não significativo) = 0,1016;  $****p = <0,0001$  (D)]. Coloração em azul = DAPI, núcleo celular; verde = calceína, células vivas; vermelho = homodímero de etídio-1, células mortas. Em todas as condições,  $n = 3$ . As imagens foram obtidas em aumento de 10x após 24h de tratamento. Scale bar = 100μm.

## 5.2. Células tratadas com mitoxantrona apresentam diminuição da expressão da LMWPTP.

Após constatarmos a influência da MTX na proliferação e viabilidade celular do CRC, e considerando um estudo prévio realizado por nosso grupo (HOEKSTRA et al., 2015) que demonstrou o papel significativo da LMWPTP na progressão do CRC, direcionamos nossa atenção para investigar uma possível modulação da LMWPTP pela MTX. Dessa forma, investigamos se a MTX poderia afetar a LMWPTP em ambos os modelos 2D e 3D.

As células HT29 foram as mais afetadas pelo tratamento com MTX (Figuras 11A-D). Como é possível ver nas Figuras 11E, D o tratamento resultou em uma redução na quantidade de LMWPTP em mais de 50% na maior concentração 10 $\mu$ M, sendo esta significativa nas células HT29 em 2D. Este achado também foi encontrado nos esferoides. As Figuras 11A -D indicam uma redução significativa da quantidade da LMWPTP nos esferoides derivados das células HT29, após tratamento com a MTX, enquanto na HCT116 o nível enzimático permaneceu inalterado.

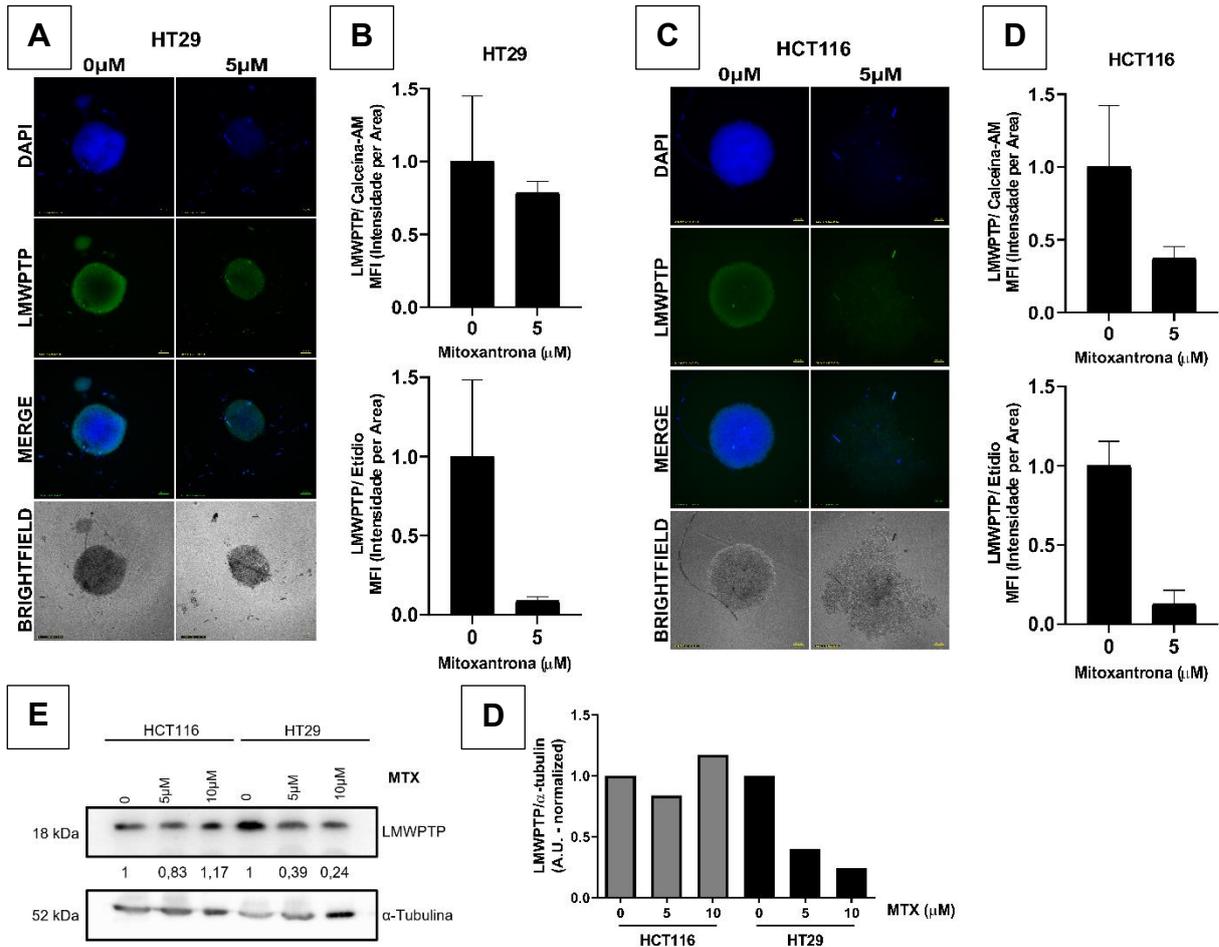
Devido ao efeito do tratamento com MTX sobre o nível dessa enzima fosfatase, decidimos averiguar se haveria a possibilidade de interação entre esse quimioterápico e a LMWPTP. Prosseguimos então com estudos de docagem molecular.

Para a docagem, baseamos na estrutura molecular da MTX e na estrutura cristalina da LMWPTP disponível no PDB ID: 5KQG (HE et al., 2016). Podemos notar uma interação MTX-LMWPTP (Figura 12). As Figuras 12A,B mostram a posição da MTX no sítio ático da LMWPTP, exibindo tal interação. A estrutura cristalina do receptor utilizada apresenta um bolso hidrofóbico no sítio ativo, no qual o ligante 6VX se acomoda. Um aspecto intrigante é a disposição das cadeias laterais do aminoalquil da MTX, as quais estão completamente fora do plano em relação à sua unidade tricíclica planar (Figura 12A, B), estabelecendo ligações de hidrogênio essenciais entre este quimioterápico e os resíduos da LMWPTP.

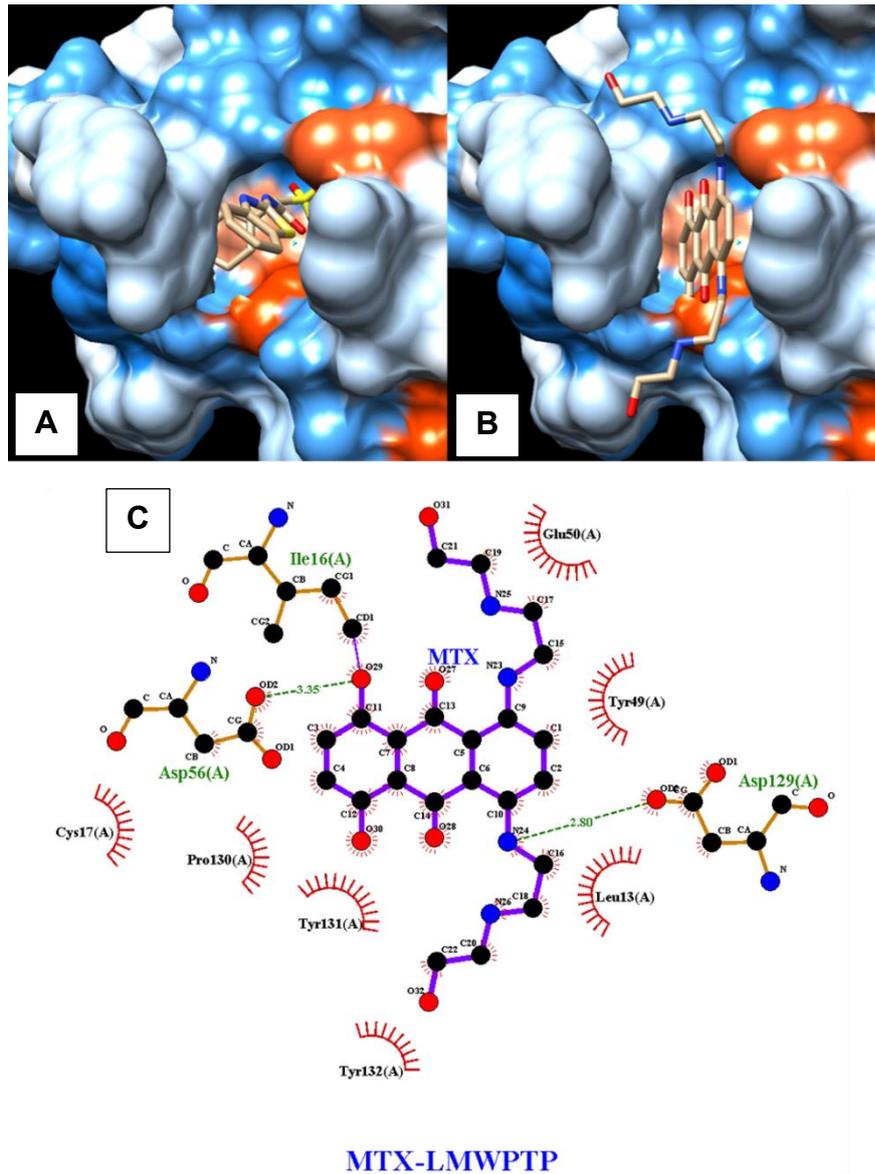
De fato, na Figura 12C vemos ligações de hidrogênio entre a MTX e resíduos Asp56 e Asp129 e interações de van der Waals com Leu13, Cys17, Tyr49, Glu50, Pro130, Tyr131 e Tyr132. Além disso, foi possível observar a MTX interagindo com resíduos envolvidos nos mecanismos de autorregulação da LMWPTP (Tyr131 e Tyr132); esses resíduos estão localizados na região da alça de laço do sítio ativo da LMWPTP. A fosforilação desses resíduos modula a seletividade e a atividade enzimática da LMWPTP (SOUZA et al., 2009). Quando

fosforilados, eles podem afetar a conformação da alça de laço e, conseqüentemente, a acessibilidade ao sítio ativo dessa PTP.

Estes achados exibem, pela primeira vez, a influência da MTX sobre uma PTP. Além de proporcionar uma perspectiva mais clara das interações moleculares subjacentes à influência da MTX sobre a LMWPTP.



**Figura 11. Mitoxantrona impacta negativamente o nível da proteína tirosina de baixo peso molecular (LMWPTP) nas células de câncer de colorretal.** Análise por microscopia de fluorescência da LMWPTP nas células HT29 (A) e HCT116 (C) após tratamento com mitoxantrona por 24h. B e D mostram a razão entre o score de intensidade de fluorescência/calceína (ou homodímero de etídio) em relação ao controle. (E,D) Expressão da LMWPTP em células de câncer colorretal cultivadas em 2D e tratadas com mitoxantrona.  $\alpha$ -Tubulina foi usado como controle interno. Coloração em azul = DAPI, núcleo celular; verde = LMWPTP. Em todas as condições,  $n$  (experimental) = 3. As imagens foram obtidas em aumento de 10x após 24h. Scale bar = 100 $\mu$ m. MTX= mitoxantrona.



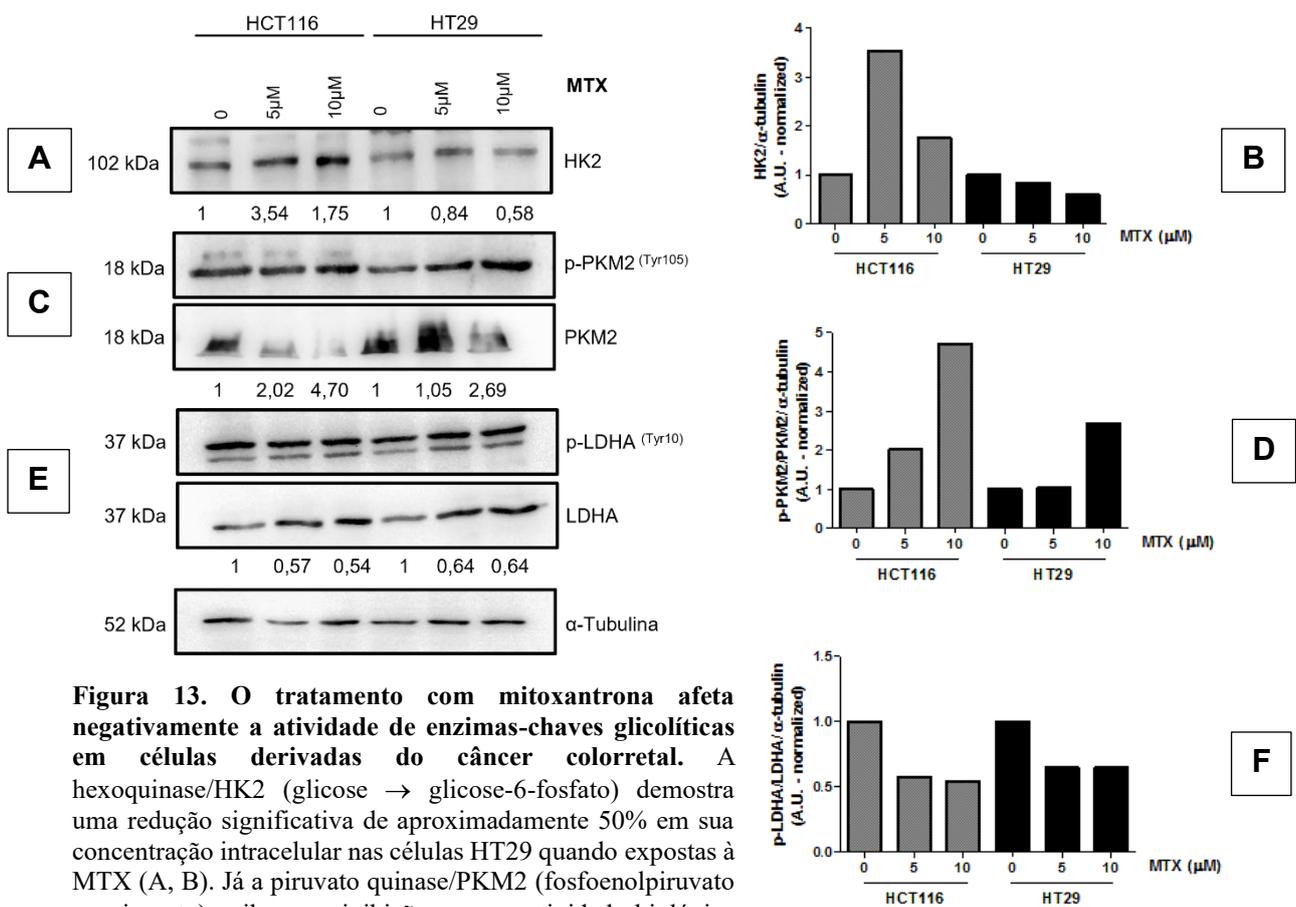
**Figura 12. Interação LMWPTP-MTX através do sítio ativo.** (A) Ligante co-cristalizado 6VX em LMWPTP; (B) Interação do sítio da LMWPTP acoplado com mitoxantrona.; (C) Diagrama de interação 2D da mitoxantrona com os resíduos de aminoácidos da LMWPTP. Cores do diagrama 2D: preto (carbono), azul (nitrogênio), vermelho (oxigênio). Diagrama esquemático criado com LIGPLOT<sup>+</sup>. Ligações de hidrogênio dentro dos comprimentos dados são indicadas como pontilhadas verdes. As estruturas ciliares em vermelho ao redor dos nomes dos resíduos da proteína e os átomos ligantes representam interações hidrofóbicas. MTX = mitoxantrona.

### 5.3. Mitoxantrona altera a atividade das enzimas do metabolismo da glicose.

Anteriormente, demonstramos que células cancerígenas que superexpressam a LMWPTP exibem um fenótipo glicolítico, como é o caso da linhagem HT29 em comparação com a HCT116 (FARIA et al., 2017). Portanto, considerando a influência do tratamento com MTX nos níveis de LMWPTP, investigamos o comportamento de algumas enzimas glicolíticas-chave, após o tratamento das células CRC. Detectou-se que a expressão da HK2 aumentou nas

células HCT116, enquanto as células HT29 exibiram cerca de 50% de diminuição dessa enzima (Figura 13).

Além disso, observou-se uma modulação negativa na atividade da PKM2 e da LDHA, como indicado pela razão enzima fosforilada/enzima não-fosforilada. Isso foi particularmente evidente no aumento marcante da fosforilação do resíduo inibitório (*Tyr105*) PKM2, que demonstrou um aumento de duas e quatro vezes nas linhagens HT29 e HCT116, respectivamente. De forma similar, no caso da LDHA, o resíduo ativador *Tyr10* fosforilado apresentou uma redução significativa em ambas as linhagens celulares (Figura 13)



**Figura 13. O tratamento com mitoxantrona afeta negativamente a atividade de enzimas-chaves glicolíticas em células derivadas do câncer colorretal.** A hexoquinase/HK2 (glicose → glicose-6-fosfato) demonstra uma redução significativa de aproximadamente 50% em sua concentração intracelular nas células HT29 quando expostas à MTX (A, B). Já a piruvato quinase/PKM2 (fosfoenolpiruvato → piruvato) exibe uma inibição em sua atividade biológica sob tratamento. Isso é evidenciado pelo aumento expressivo de seu resíduo inibitório *Tyr105* p-PKM2 (C, D) principalmente nas células HCT116. Por fim, a lactato desidrogenase/LDHA (piruvato → lactato) crucial no efeito Warburg, apresenta uma redução extremamente significativa no processo de ativação quando exposta à MTX; sua forma ativa (p-LDHA *Tyr10*) reduzida (E, F). As células foram tratadas com MTX pelo período de 24h. A expressão das enzimas e o estado de fosforilação (PKM2 e LDHA) foram avaliados pelo *western blot* e a análise densitométrica foi realizada através do software ImageJ. Os valores arbitrários são exibidos abaixo das bandas.  $\alpha$ -Tubulina foi utilizado como controle interno. *Tyr* = resíduo de tirosina. p = enzima fosforilada.

## 6. DISCUSSÃO

No decorrer do entendimento da biologia dos distintos tipos de câncer, significativos progressos têm sido alcançados, resultando em aprimoramentos nos tratamentos, contribuindo para uma notável extensão da sobrevida e melhoria na qualidade de vida dos pacientes afetados. Contudo, desafios persistem, especialmente no que concerne ao diagnóstico precoce e às abordagens terapêuticas aplicáveis aos tumores caracterizados por um perfil metastático (BRADLEY, 2018).

**Tabela 7. Principais resultados obtidos a partir da perspectiva molecular.**

Alvo avaliado ou via metabólica	Efeito pós-tratamento com MTX	
	HT29	HCT116
PKM2	↑ 2x fosforilação no resíduo inibitório Tyr105: ↓ atividade	↑ 4x fosforilação no resíduo inibitório Tyr105: ↓ atividade
p-LDH (resíduo ativador) /LDH	LDH forma ativa ↓	LDH forma ativa ↓
HK2	↓	↑
LMWPTP	↓	Inalterado
Efeito Warburg	↓	Fenótipo oxidativo mantido

↑ = aumentada(o)    ↓ = diminuída(o)

Na Tabela 7, destaca-se a recapitulação dos principais resultados obtidos neste estudo, em termos do impacto da MTX no metabolismo glicolítico, oferecendo uma síntese concisa das contribuições e descobertas relevantes.

A capacidade da MTX em induzir a apoptose em diversas células cancerígenas, incluindo aquelas associadas ao CRC, é reconhecida na literatura (HORNUNG et al., 2015). No âmbito de nosso estudo, apresentamos evidências acerca da eficácia do tratamento com MTX em suprimir a sobrevivência das células de CRC, tanto em ambientes de cultura 2D quanto 3D. Em particular, na cultura tridimensional (3D), observamos uma distribuição homogênea do quimioterápico por todo o esferoide, concordando com achados de Hornung e colaboradores (2015) em esferoides derivados de células HT29.

A análise da viabilidade celular, utilizando marcação com calceína e homodímero de etídio, revelou uma extensa área do esferoide tratado com MTX apresentando morte celular.

Apesar da reconhecida propriedade antitumoral da MTX, os mecanismos moleculares subjacentes a essa ação ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se que este quimioterápico exerce seus efeitos anticancerígenos induzindo danos a molécula de DNA, resultando na quebra da dupla hélice e, conseqüentemente, desencadeando o processo apoptótico (DIETEL et al., 1988; TOH; LI, 2011).

Ambas as linhagens celulares (HT29 e HCT116) demonstraram sensibilidade semelhante à MTX quando cultivadas em monocamada (2D). Do ponto de vista metabólico, evidenciamos uma diminuição na conversão do MTT, indicando uma redução na viabilidade celular. Esses achados fortalecem e complementam os dados anteriormente descritos, alinhando-se com o que já foi documentado na literatura por Dietel e colaboradores (1988) e Toh & Li (2011) acerca da ação antiproliferativa da MTX.

Notavelmente, as células HT29, exibem elevada expressão da LMWPTP (CLERICI et al., 2021) e um perfil metabólico glicolítico, apresentando uma sensibilidade reduzida a agentes citotóxicos em comparação com as células HCT116. Curiosamente, ambas as linhagens celulares exibiram resposta semelhante à MTX, e, de maneira crucial, a LMWPTP foi modulada pelo tratamento. Este resultado mostra, pela primeira vez, que a MTX tem efeito sobre uma PTP. Especificamente, a LMWPTP foi definida como um “marcador do câncer”, pois promove a metástase e a resistência de células cancerígenas (FERREIRA-HALDER et al., 2020).

Ainda, esta enzima modula vias de sinalização que resultam no crescimento e na proliferação celular. Em um estudo, Hoekstra e colaboradores (2015), demonstraram que a LMWPTP apresenta níveis elevados em linhagens de CRC como HCT116 e CACO-2, devido a uma superexpressão do gene que codifica essa proteína (*ACPI*). Hoekstra também evidenciou que a LMWPTP atua como mediadora da resistência à quimioterapia e da migração de células de CRC (HOEKSTRA et al., 2015). No contexto da docagem da LMWPTP, é crucial observar que, devido ao tamanho do composto, inicialmente não seria possível, que este se encaixasse no sítio ativo da enzima. Porém, de forma intrigante, a MTX apresentou uma boa adaptação à estrutura docada, que possui um bolsão hidrofóbico peculiar. Este fenômeno suscita a possibilidade de que esse seja o mecanismo de ação da MTX, uma hipótese que merece investigações mais aprofundadas.

Em relação ao metabolismo da glicose, a administração da MTX culminou na inibição tanto da PKM2 e quanto da LDHA. A PKM2, catalisa a conversão do fosfoenolpiruvato a piruvato. Dependendo da função metabólica do tecido, diferentes isoformas podem ser

expressas: PKM1 ou PKM2. Notavelmente, a isoforma PKM2 tem emergido como um alvo promissor para a terapia do câncer, devido ao seu papel crucial na regulação dos níveis de energia celular, homeostase redox e capacidade de proliferação (FILIPP, 2013; IQBAL et al., 2014). A fosforilação do resíduo de tirosina das enzimas glicolíticas aumenta as atividades da maioria das enzimas desta via, promovendo aumento da taxa glicolítica e proliferação das células cancerígenas. Paradoxalmente, no entanto, a fosforilação da tirosina (*Tyr105*) da PKM2 resulta em atividade diminuída, e essa diminuição na atividade promove o efeito Warburg. Além disso, a PKM2 é capaz de atuar como uma PK utilizando fosfoenolpiruvato como substrato para promover a tumorigênese. Assim, estudos atuais buscam compreender o papel das atividades clássica e não canônica da PKM2 na promoção do efeito Warburg e no crescimento tumoral.

Por outro lado, há relatos que a diminuição da atividade da PKM2 resultada em citotoxicidade, como evidenciado pela curcumina, que demonstrou inibir a proliferação de células cancerígenas e diminuir a expressão de PKM2. Essa diminuição, mediada pela curcumina, na expressão de PKM2 levou a uma diminuição do consumo de glicose, produção de lactato e proliferação celular (SIDDIQUI et al., 2018). Embora a PKM2 seja uma mediadora chave da glicólise em células cancerígenas, a falta de agentes seletivos direcionados à PKM2 continua sendo um desafio na busca por estratégias terapêuticas de vias metabólicas no câncer. Em paralelo, estudos de Babu e colaboradores (2018) reportaram que células de melanoma tratadas com lapachol apresentaram inibição da glicólise dependente da dose, aumento correspondente no consumo de oxigênio e inibição da PKM2. A interrupção da glicólise pelo lapachol resultou na diminuição dos níveis de ATP e na inibição da proliferação celular. Apesar de seu papel crítico na glicólise, a depleção de PKM2 não reduziu significativamente o crescimento do tumor, e a exclusão de PKM2 não alterou a progressão do tumor em camundongos, sugerindo que a plasticidade metabólica permite que os tumores mudem para um metabolismo alternativo para sustentar o crescimento dos mesmos. Desta forma, as conclusões de Babu e colaboradores indicam que a inibição da glicólise pelo lapachol sensibilizou as células para o dinitrofenol, um agente que tem como alvo terapêutico a mitocôndria, evidenciando que uma combinação de agentes direcionados à glicólise das células cancerígenas e ao metabolismo mitocondrial pode representar uma estratégia eficaz para o tratamento do câncer (BABU et al., 2018). Portanto, esses achados sugerem que a MTX pode desempenhar um papel na sensibilização das células cancerígenas de CRC, proporcionando uma abordagem terapêutica combinada promissora.

A LDHA é a principal enzima que regula o efeito Warburg, ao catalisar a conversão do piruvato e NADH em lactato e NAD<sup>+</sup>. Estudos destacam que a supressão da glicólise por meio de inibidores da LDHA, como FX11 e oxamato, interfere na progressão do câncer ao induzir estresse oxidativo (LE et al., 2010; YANG et al., 2014). Elevada expressão de LDHA tem sido observada em vários tipos de câncer, associando-a à progressão maligna (YANG et al., 2014).

Quanto a HK2, responsável por catalisar a reação glicose a glicose-6 fosfato, observamos que a linhagem celular HCT116, apresentou aumento na quantidade desta enzima, enquanto na HT29 houve diminuição. A alta expressão de HK2 está associada com um baixa índice de sobrevivência dos pacientes em diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de mama, câncer gástrico, linfoma não Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo e carcinoma hepatocelular. Especificamente no CRC, a HK2 apresenta expressão significativamente elevada. Wang e colaboradores (2018) demonstraram que a terapia combinada de anticorpo monoclonal cetuximab, juntamente com quimioterapia, exerce efeito sobre a alta expressão de HK2 (WANG et al., 2018).

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta novas perspectivas no entendimento molecular relacionados à eficácia da mitoxantrona como agente anticancerígeno, com foco em dois “marcadores” do câncer: o efeito Warburg e a enzima LMWPTP. Destaca-se a notável capacidade da MTX em penetrar nos esferoides, evidenciada pela marcante coloração azul que permeia toda a extensão dessas estruturas tridimensionais. Esta capacidade contribui de forma significativa para a potencialização do efeito terapêutico de inibir a viabilidade das células cancerígenas que compõem este complexo modelo de estudo.

Além disso, a MTX exerce influência sobre o efeito Warburg, promovendo uma modulação negativa, especialmente nas células HT29. A LMWPTP, por sua vez, figura um alvo relevante devido ao seu papel na quimiorresistência e na estimulação do efeito Warburg. Nesta enzima, a MTX induziu uma regulação negativa na expressão, além de interagir diretamente com a LMWPTP através do sítio ativo, demonstrando, pela primeira vez, um efeito deste quimioterápico em uma PTP.

A modulação desencadeada pela MTX na LMWPTP, LDHA e PKM2 emerge como uma oportunidade promissora para desativar as características associadas à reprogramação do metabolismo da glicose nas células de câncer colorretal. Essa abordagem, ao reduzir as vantagens de sobrevivência das células cancerígenas, abre caminho para inovadoras estratégias terapêuticas no tratamento deste tipo de câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, D. et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, v. 2, 2013.

ALZHRANI, S. M.; AL DOGHAITHER, H. A.; AL-GHAFAR, A. B. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (review). *Molecular and Clinical Oncology*, v. 15, n. 6, 2021.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal Cancer Facts and Figure 2017-2019 Global Headquarters: American Cancer Society Inc. [s.l: s.n.].

BABU, M. S. et al. Lapachol inhibits glycolysis in cancer cells by targeting pyruvate kinase M2. *PLoS ONE*, 2018.

BAHRAMI, A. et al. Targeting RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 2018a.

BAHRAMI, A. et al. Therapeutic Potential of Targeting PI3K/AKT Pathway in Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 119, n. 3, 2018b.

BRADLEY, C. A. CXCR4–HIF-1 $\alpha$  interaction drives metastasis. *Nature Reviews Urology*, v. 15, n. 12, p. 726–726, 12 dez. 2018.

BRENNER, H.; CHEN, C. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *British Journal of Cancer*, 2018.

CLERICI, S. P. et al. Colorectal Cancer Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Educate Human Fibroblasts to Stimulate Migratory Capacity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, 2021.

DIETEL, M. et al. Effectiveness of mitoxantrone on the proliferation of cell cultures derived from malignant mesenchymal tumors of human origin. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 114, n. 2, p. 197–203, abr. 1988.

FARIA, A. V. S. et al. Oncophosphosignaling Favors a Glycolytic Phenotype in Human Drug Resistant Leukemia. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 118, n. 11, p. 3846–3854, nov. 2017.

FARIA, A. V. S. et al. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase as signaling hub of cancer hallmarks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021.

FARIA, A. V. S. et al. Violacein switches off low molecular weight tyrosine phosphatase and rewires mitochondria in colorectal cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, v. 127, 2022.

FERREIRA-HALDER, C. V. et al. Protein Tyrosine Phosphatases in Tumor Progression and Metastasis: Promoter or Protection? Em: ELSIVIER (Ed.). *Tumor Progression and Metastasis*. 1. ed. [s.l.] IntechOpen, 2020. p. 411–445.

FILIPP, F. Cancer metabolism meets systems biology: Pyruvate kinase isoform PKM2 is a metabolic master regulator. *Journal of Carcinogenesis*, v. 12, n. 1, p. 14, 2013.

- GRIFFIN, C. et al. Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 10, n. 1, 2011.
- HAWKINS, P. C. D. et al. Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and cambridge structural database. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2010.
- HAWKINS, P. C. D.; NICHOLLS, A. Conformer generation with OMEGA: Learning from the data set and the analysis of failures. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012.
- HOEKSTRA, E. et al. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMWPTP) upregulation mediates malignant potential in colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 8300–8312, 2015.
- HORNUNG, A. et al. Treatment efficiency of free and nanoparticle-loaded mitoxantrone for magnetic drug targeting in multicellular tumor spheroids. *Molecules*, v. 20, n. 10, 2015.
- HOWLADER, N. et al. SEER cancer statistics review. National Cancer Institute, p. 1975-2010, 2013.
- IQBAL, M. A. et al. Missense Mutations in Pyruvate Kinase M2 Promote Cancer Metabolism, Oxidative Endurance, Anchorage Independence, and Tumor Growth in a Dominant Negative Manner. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 12, p. 8098–8105, 21 mar. 2014.
- JOHNSON, C. M. et al. Meta-Analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes and Control*, v. 24, n. 6, 2013.
- KUIPERS, E. J. et al. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers* 2015 1:1, v. 1, n. 1, p. 1–25, 5 nov. 2015.
- LE, A. et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 5, p. 2037–2042, 2 fev. 2010.
- LIN, C. et al. Role of gut microbiota in the development and treatment of colorectal cancer. *Digestion*, 2019.
- LIU, Y.; BODMER, W. F. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 4, 2006.
- MARKOWITZ, S. D.; BERTAGNOLLI, M. M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 2009.
- MARLEY, A. R.; NAN, H. Epidemiology of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 2016.
- MCGANN, M. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011.
- MCGANN, M. R. et al. Gaussian docking functions. *Biopolymers*, v. 68, n. 1, p. 76–90, jan. 2003.

MORÁN, A. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, v. 2, n. 3, 2010.

MOURADOV, D. et al. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Research*, v. 74, n. 12, 2014.

OGINO, S. et al. Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: An emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut*, 2011.

OLIVEIRA, P. F. DE S. VIOLACEÍNA DESLIGA A SINALIZAÇÃO DEPENDENTE DOS RECEPTORES TIROSINA QUINASES (AXL E EGFR) EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL (HT29). [s.l.: s.n.].

RUELA-DE-SOUSA, R. R. et al. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase predicts prostate cancer outcome by increasing the metastatic potential. *European Urology*, 2016.

SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

SIDDIQUI, F. A. et al. Curcumin decreases Warburg effect in cancer cells by down-regulating pyruvate kinase M2 via mTOR-HIF1 $\alpha$  inhibition. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 8323, 29 dez. 2018.

SILVA, M.; ERRANTE, P. R. Câncer colorretal: fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 13, n. 33, 2017.

SOCIETY, A. C. Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016. *Colorectal Cancer Facts and Figures*, 2014.

SOUZA, A. C. S. et al. From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 7, p. 1140–1153, 11 abr. 2009.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

TOH, Y. M.; LI, T. K. Mitoxantrone inhibits HIF-1 $\alpha$  expression in a topoisomerase II-independent pathway. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 15, p. 5026–5037, 2011.

TORTORA, G. J. Sistema Digestório. Em: *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koognan, 2016. p. 1207–1226.

WANG, H. et al. Effect of HK2, PKM2 and LDHA on Cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer. *Oncology Letters*, 8 fev. 2018.

YANG, Y. et al. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*, v. 5, n. 23, p. 11886–11896, 15 dez. 2014.

## **CAPÍTULO 3:**

### **RASTREAMENTO DA RESPOSTA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ESÔFAGO À MITOXANTRONA**

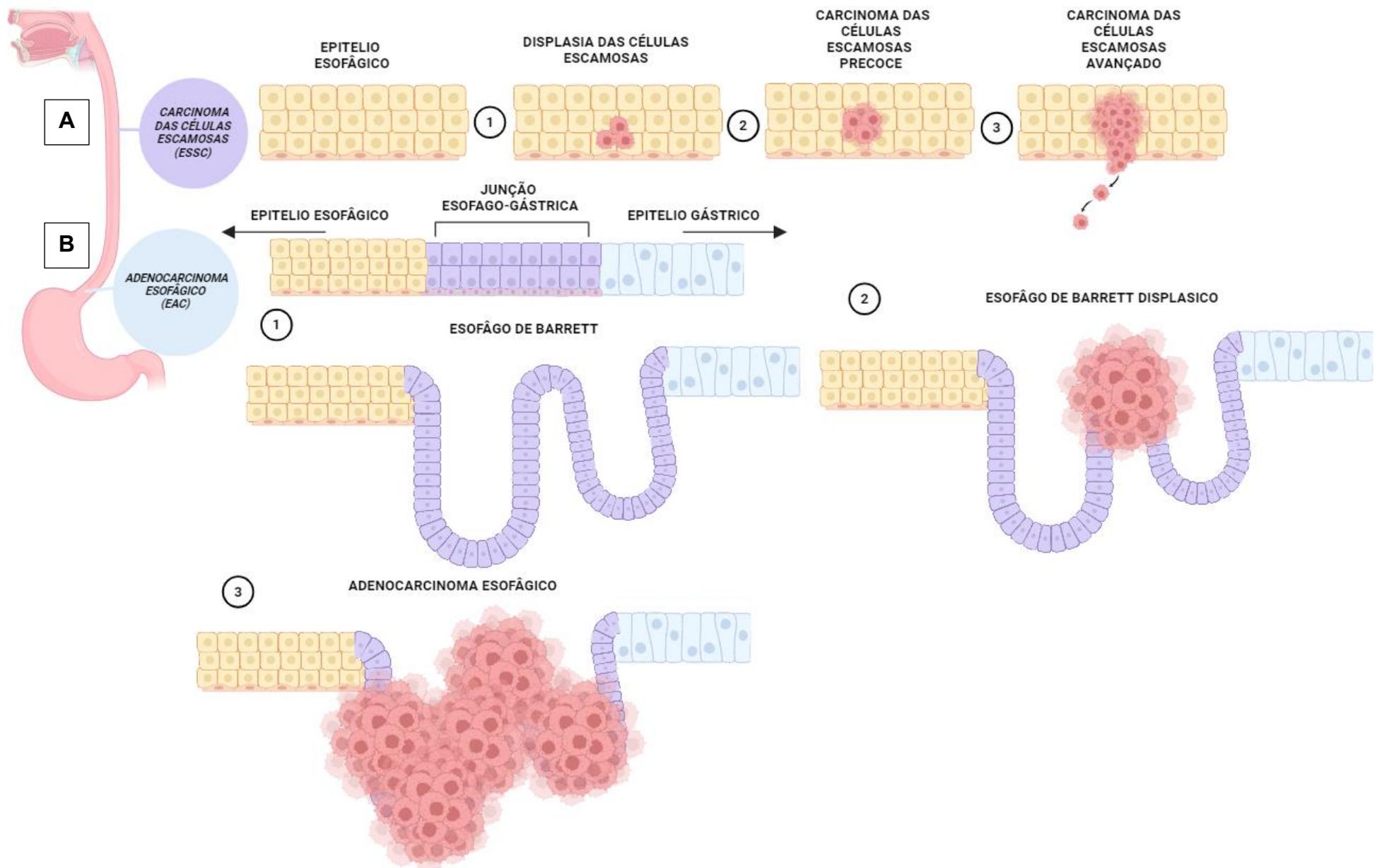
---

#### **1. INTRODUÇÃO**

##### **1.1. CÂNCER DE ESÔFAGO**

O esôfago desempenha a função de deglutição e transporte do alimento em direção ao estômago. Durante a ingestão, a musculatura esofágica realiza contrações coordenadas que impulsionam o conteúdo ingerido da faringe em direção ao estômago sendo regulado pelo esfíncter, um tecido muscular localizado na região da cárdia. O esfíncter atua como uma barreira física ao bloquear o refluxo gástrico em direção ao esôfago, mitigando lesões gastroesofágicas (SILVERTHORN, 2017). Em um contexto patológico, as células epiteliais esofágicas saudáveis sofrem alterações genéticas, proliferando-se de maneira descontrolada. Com uma prevalência mundial alarmante, o câncer de esôfago traz consigo um impacto econômico e significativo grau de mortalidade.

Somados, os cânceres que acometem o trato gastrointestinal incluindo o câncer de esôfago (EC), diminuem, aproximadamente, um terço dos anos de vida com qualidade de seu portador, por incapacidade funcional (KAMANGAR et al., 2020). Existem dois principais subtipos histológicos: carcinoma de células escamosas (ESCC) e adenocarcinoma (EAC). Esses dois subtipos de câncer de esôfago são distintos anatômica, biológica e histologicamente, podendo ser influenciados por diferentes fatores de risco (SMYTH et al., 2017). O ESCC desenvolve-se a partir de células epiteliais escamosas e é comumente encontrado nos terços médio e inferior do esôfago. Por outro lado, o EAC tem origem no epitélio do esôfago de Barrett e afeta principalmente as células glandulares presentes no revestimento interno do órgão, sendo restrito a porção distal próxima à junção gastroesofágica. No entanto, é importante ressaltar que ambos os subtipos podem ocorrer em qualquer parte do esôfago (DAKUBO, 2017). A Figura 14 elucida de forma esquemática como ocorre o desenvolvimento do ESCC e EAC.



**Figura 14. Patogênese e fisiopatologia do carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma.** O desenvolvimento do carcinoma de células escamosas segue um padrão de progressão que envolve displasia (A1) e finalmente a formação do carcinoma (A2, 3). Já o adenocarcinoma surge a partir do esôfago de Barrett (B1), que é caracterizado por displasia (B2), e, em seguida, ocorrem mutações genéticas, instabilidade cromossômica, variação estrutural e superexpressão, levando ao desenvolvimento do adenocarcinoma (B3). Essas diferenças biológicas destacam ainda mais a distinção entre os dois tipos de câncer. Adaptado de (REICHENBACH et al., 2019). Ilustração realizada com a ferramenta *BioRender*.

## 1.2. FATORES DE RISCO

### 1.2.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

O ESCC está atrelado a fatores de risco relacionados ao estilo de vida. Além disso, a alta frequência de lesão térmica no tecido esofágico está associada a este carcinoma (SMYTH et al., 2017). Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer estão:

- **Fumo/Cigarro** – Altera quimicamente as células devido aos carcinógenos, tais como hidrocarbonetos policíclicos, nitrosaminas e acetaldeído. Associado a elevada temperatura (calor) que promove lesões térmicas no tecido.
- **Álcool** – Possui efeito deletério nas células devido ao acetaldeído, secundários à oxidação pela microbiota oral e produtos salivares. Em sinergia, o álcool e o cigarro aumentam potencialmente o risco de desenvolvimento do carcinoma do esôfago.
- **Dieta** – Baixa ingestão de micronutrientes, como vitamina A e E.
- **Lesão Térmica** – Ingestão de líquidos quentes levam a lesões no tecido.

### 1.2.2. ADENOCARCINOMA

Os fatores de risco do EAC estão relacionados a condições específicas, como o refluxo biliar ou estomacal, evidência de esôfago de Barrett e alta ingestão de carne vermelha, bem como baixa ingestão de vegetais e frutas. Essas condições contribuem para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (DAKUBO, 2017; SMYTH et al., 2017). Dentre os principais fatores de risco para a patogênese do EAC, estão inclusos:

- **Esôfago de Barrett** – Promovido pelo refluxo do suco gástrico e/ou biliar, este ocorre quando o epitélio escamoso estratificado que protege o tecido esofágico é substituído por um epitélio colunar simples. Tal epitélio, agora substituído, perde a capacidade de proteção às células, tornando-as mais susceptíveis a alterações moleculares. As células epiteliais colunares são categorizadas em três tipos: gástrico-fúndicas, cárdicas e intestinais, sendo que todas podem conter células caliciformes. Dos três, apenas a intestinal apresenta risco de progressão para EAC. O baixo pH do suco gástrico induz a ativação das células troncos em células caliciformes, as quais, em uma tentativa de

proteger o tecido do esôfago, sintetizam e secretam a proteína mucina, resultando em um fenótipo colunar simples intestinal, conhecido como Barrett. Além disso, a obesidade também contribui para seu desenvolvimento, uma vez que aumenta a pressão intra-abdominal e, induz o refluxo estomacal.

### **1.3. EPIDEMIOLOGIA**

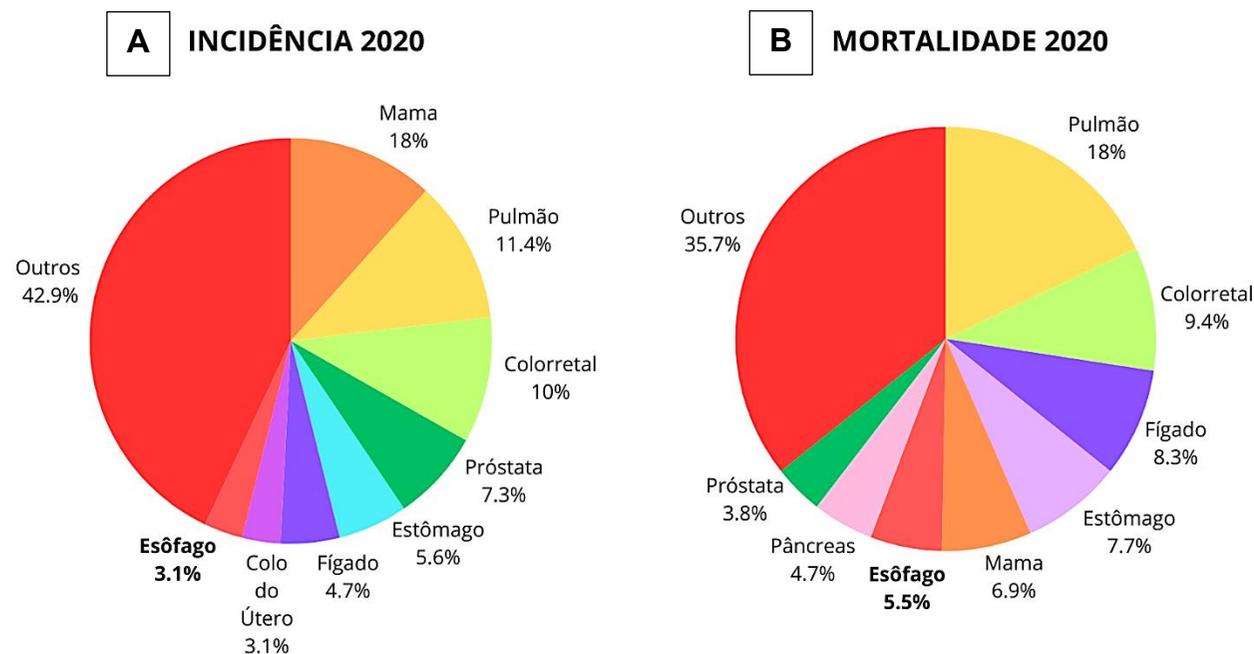
Mundialmente, o EC ocupa a sétima posição em incidência e a sexta em mortalidade (Figura 15) (SUNG et al., 2021). Entretanto, há grandes variações quando consideradas as distintas populações. Por exemplo, regiões da Ásia (leste e centro-sul) e partes da África (leste e sul) exibem elevadas taxas de EC, enquanto as taxas mais reduzidas concentram-se na América Central e oeste da África. O ESCC corresponde a 80% dos diagnósticos, tornando-se o subtipo mais prevalente. Conseqüentemente, por mais de quatro décadas, o EAC foi pouco estudado durante as investigações etiológicas, dada sua representatividade em aproximadamente 20% dos casos. Apesar disso, é notável o aumento significativo na incidência deste subtipo, especialmente em países desenvolvidos (ABNET; ARNOLD; WEI, 2018; SHEIKH et al., 2023). De fato, em alguns países, como a Austrália, o Canadá, os EUA e o norte da Europa, o EAC emerge como a manifestação mais comum (KAMANGAR et al., 2020). No que tange ao gênero, o sexo masculino é o mais suscetível, com variações notáveis entre a razão masculino/feminino nas populações (SHEIKH et al., 2023).

No contexto brasileiro, as taxas de incidência do EC revelam variações entre distintas regiões do país, destacando-se disparidades significativas entre os sexos e as áreas geográficas, sendo a região Sul detentora da mais elevada estimativa tanto de incidência quanto mortalidade. Apesar destas disparidades regionais e de gênero, faz-se necessário ressaltar que o EC apresenta índices de letalidade substanciais no Brasil, ocupando a sexta posição (mortalidade) entre os tipos de câncer, para ambos os sexos (ANDRADE et al., 2018; INCA, 2023).

Tabela 8. Número estimado de novos casos e mortes em 2020 para câncer esôfago, ambos os sexos, todas as idades.

	INCIDÊNCIA			MORTALIDADE		
	Ambos os sexos	Homens	Mulheres	Ambos os sexos	Homens	Mulheres
<b>Mundial</b>	604.100	418.350	185.750	508.585	357.190	151.395
<b>América do Sul</b>	17.337 (82.7%)	12.673 (82%)	4.664 (84.4%)	14.588 (81.5%)	10.935 (81%)	3.653 (83.3%)
<b>Brasil</b>	10.363 (59.8%)	8.112 (64%)	2.251 (48.3%)	9.786 (67.1%)	7.678 (70.2%)	2.108 (57.7%)

Informações retiradas do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN): Cancer Today <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em 27 dez 2023.



**Figura 15. Estimativas da incidência dos cânceres e da mortalidade causada pelos mesmos para o ano de 2020.** Percentuais correspondentes aos casos diagnosticados (A) e de óbitos (B), abrangendo todas as faixa etárias e ambos os sexos. Note que o câncer de esôfago (destacado em negrito) encontra-se na sétima e sexta posição em incidência e mortalidade, respectivamente. Adaptado de The *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN): *Oesophagus Facts Sheet 2020*. Acesso em 27 dez 2023.

## 1.4. LINHAGENS DE ESOFÂGO

### 1.4.1. METABOLISMO

Em uma revisão sistemática, Huang e colaboradores (2020) delinearão de forma abrangente as descobertas anteriores acerca dos metabólitos intermediários e perfis metabolômicos/energéticos associados ao EC. Isso incluiu uma análise minuciosa do metabolismo de carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos (HUANG et al., 2020).

Dentre os intermediários envolvidos na fosforilação oxidativa, como ácido láctico, glicose, citrato e ácido fumárico, observou-se uma recorrência frequente em sua menção, contudo, a falta de consistência nos resultados foi notável. Por exemplo, o aumento de citrato foi relatado em cinco estudos, enquanto um único estudo indicou sua diminuição. Adicionalmente, outro estudo revelou aumento do ácido  $\alpha$ -cetoglutárico e diminuição do ácido isocítrico. Os autores tentaram fornecer um resumo da alteração nas vias metabólicas ou esclarecer o perfil energético dentro do metabolismo de carboidratos, porém, não encontraram descobertas diretas. Da mesma forma, intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (citrato, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico e ácido fumárico) foram identificados em cânceres GI, embora apresentem inconsistências, destacando a necessidade de investigações adicionais. O ácido fumárico e o citrato foram determinados como os intermediários mais frequentemente relatados do TCA; entretanto, a inconsistência entre os estudos reforça a demanda por investigações adicionais.

Apesar disso, a detecção consistente dos intermediários-chave da glicólise, como glicose, frutose, gliceraldeído e ácido pirúvico serem desregulados em todos os estudos exibidos na revisão, corrobora para o reconhecimento do efeito Warburg ser prevalente no EC. É importante ressaltar que apesar da predileção das células cancerígenas pela glicólise em detrimento da fosforilação oxidativa, o aumento nos níveis de intermediários do ciclo do TCA pode contribuir para o desenvolvimento do câncer, além de manter o efeito Warburg constantemente ativo. Isso ocorre devido ao processo de anaplerose, que se refere ao reabastecimento de metabólitos do TCA por meio da geração de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de glutamato. Glutamato está frequentemente alterado no câncer de esôfago reforçando a interconexão entre efeito Warburg e ciclo do TCA nesse tipo de câncer.

No metabolismo de aminoácidos, Huang e colaboradores (2020) observaram que os artigos compilados revelaram disfunção em triptofano, lisina, serina, arginina, isoleucina,

tirosina, glicina, metionina, histidina e leucina. Tais alterações podem refletir a utilização excessiva de aminoácidos pelos tecidos tumorais, a degradação da matriz extracelular, além da conversão de valina em intermediários do ciclo do TCA para geração de energia. É importante esclarecer aqui que a valina exibe níveis elevados nos cânceres de GI, em especial no EC. Apesar desses estudos serem discutido brevemente, os potenciais mecanismos biológicos dos aminoácidos supracitados, nenhum examinou diretamente as vias ou perfis associados ao EC usando abordagens estatísticas, levando a resultados discrepantes.

Por fim, os autores destacam que diversos estudos foram realizados com foco nos nucleotídeos associados ao EC. A revisão dos dados gerados destes estudos, revelou um aumento significativo dos níveis dos nucleotídeos pirimidina, adenina e compostos contendo uridina, bem como uma diminuição da uracila nos tecidos de EC, em comparação com os controles. Ainda, Huang e colaboradores (2020) evidenciam que a desregulação nas vias do metabolismo de nucleotídeos no câncer esofágico tem sido demonstrada, entretanto, os mecanismos envolvidos nesta desregulação não foram totalmente elucidados. A síntese e o metabolismo de nucleotídeos são essenciais para a geração adequada de energia e estão envolvidos em processos fundamentais como síntese do DNA e RNA, além de influenciarem a sinalização celular e o metabolismo energético. Os níveis alterados, bem como a desregulação refletem na disfunção das vias e metabolismo de nucleotídeos, associando-se ao desenvolvimento do EC.

#### 1.4.2. GENÉTICA

Os subtipos de cânceres esofágico apresentam diferenças marcantes em sua genômica, transcriptômica e epigenética, refletindo em suas etiologias e tecidos de origem, o que impacta diretamente em sua fisiopatologia. O ESCC e o EAC exibem perfis distintos de alterações na expressão de RNA e microRNA. Por exemplo, o ESCC é fortemente associado a um padrão de alteração molecular baseado na substituição dos nucleotídeos C → A, sobretudo em tabagistas. Além disso, são observadas frequentes alterações genéticas nos genes: *TP53*, *NFE2L2*, *MLL2*, *ZNF750*, *NOTCH1* e *TGFBR2*. Já o EAC e o adenocarcinoma gástrico denotam semelhanças em relação aos padrões cromossomicamente instáveis e RNA, sendo o gene *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 (ERBB2)* descrito como o mais alterado molecularmente (LAGERGREN et al., 2017).

Na coorte brasileira de ESCC, Munari e colaboradores (2021) identificaram alterações genéticas em genes relacionados ao ciclo celular nos pacientes em estágio avançado de acometimento. Dentre tais genes, destacam-se o *TP53* (85%), *NFE2L2* (11%), *RBI* (7%) e *CDKN2A* (7%) envolvidos no ciclo celular. Ainda, foram observadas alterações em vias de sinalização celular, como a via NOTCH1: NOTCH (11%); a via PI3K-AKT: PTEN (7%); a via MAPK: NF1, KRAS e BRAF (2%). Também foram encontradas alterações genéticas em receptores tirosina quinases (2%) (MUNARI et al., 2021). Essas descobertas evidenciam a complexidade molecular do carcinoma de esôfago, sustentando a necessidade de mais investigações não apenas da bioquímica moderna, mas das ciências médicas e moleculares como um todo.

Tabela 9. Linhagens celulares de câncer de esôfago humano, suas características genéticas e a doença associada.

ESSC				
	População	Paciente	Genes Alterados	Afecção
TE-7 (RRID:CVCL_9972)	Japonesa	Homem 72 anos	<i>CDKN2A</i> <sup>1</sup>	Carcinoma de células escamosas esofágico
TE-8 (RRID:CVCL_1766)	Japonesa	Homem 63 anos	<i>TP53</i> <i>HRAS</i> <sup>2*</sup> <i>CDKN2A</i> <sup>1,3</sup>	Carcinoma de células escamosas esofágico
TE-10 (RRID:CVCL_1760)	Japonesa	Homem 58 anos	<i>TP53</i> <i>NOTCH1</i> <sup>4*</sup> <i>CDKN2A</i> <sup>2,3</sup>	Carcinoma de células escamosas esofágico
TE-13 (RRID:CVCL_4463)	Japonesa	Feminino 65 anos		Carcinoma de células escamosas esofágico
EAC				
	População	Paciente	Genes Alterados	Afecção
FLO-1 (RRID:CVCL_2045)	Europeia	Homem 68 anos	<i>TP53</i>	Esôfago de Barrett
SK-GT-4 (RRID:CVCL_2195)	Europeia	Homem 89 anos	<i>KRAS</i> <sup>*</sup> <i>PIK3CA</i> <i>TP53</i> <i>RUNX1</i> <sup>5*</sup>	Adenocarcinoma esofágico
JK-ESOAD1 (RRID:CVCL_8098)	Europeia	Homem 66 anos	<i>TP53</i> <i>CDKN2A</i> <sup>5</sup>	Esôfago de Barrett
OE33 (RRID:CVCL_0471)	Europeia	Mulher 73 anos	<i>TP53</i> <i>RUNX1</i> <sup>5*</sup>	Esôfago de Barrett
ESO26 (RRID:CVCL_2035)	Europeia	Homem 56 anos	<i>TP53</i> <i>CTNNA1</i> <sup>5</sup>	Adenocarcinoma da transição esofagogástrica

\*“marcadores de câncer”; RRID = número de identificação no banco de dados *Cellosaurus* (<https://www.cellosaurus.org/index.html>); <sup>1</sup>(GALIANA et al., 1993); <sup>2</sup>(IGAKI et al., 1994); <sup>3</sup>(LIU et al., 1995); <sup>4</sup>(WANG et al., 2011); <sup>5</sup>(BOONSTRA et al., 2012).

## 2. JUSTIFICATIVA

A despeito dos progressos alcançados no diagnóstico precoce e, por conseguinte, na viabilidade de tratamento nos estágios iniciais, o prognóstico do câncer de esôfago permanece desfavorável, com uma taxa de sobrevida de cinco anos, inferior a 20% (SHEIKH et al., 2023). A complexidade biológica, anatômica e os diferentes perfis moleculares dos subtipos ESCC e EAC (SMYTH et al., 2017) desafiam a eficácia das estratégias terapêuticas, tornando-se ainda mais crítico quando a afecção alcança estágios avançados, sendo o tratamento nesses casos apenas paliativo (SHEIKH et al., 2023). Urge, portanto, a necessidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas visando aprimorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes.

Destaca-se, assim, como um desafio fundamental para o futuro a identificação de alvos moleculares baseados no perfil metabólico do câncer, capazes de adaptar aos regimes de tratamento e evoluir em direção a estratégias personalizadas. A MTX, enquanto agente antineoplásico, apresenta uma variabilidade significativa de respostas em diferentes contextos celulares, destacando a necessidade de distinguir entre as linhagens suscetíveis e as não responsivas para otimizar sua aplicação clínica. A análise aprofundada das características genéticas e epigenéticas das células tumorais, juntamente com a investigação das vias de sinalização intracelular e a análise do perfil de expressão gênica, emerge como ferramentas essenciais para discernir os mecanismos que conferem sensibilidade ou resistência à MTX.

Ademais, a caracterização das linhagens não responsivas a este quimioterápico é igualmente crucial para evitar abordagens terapêuticas infrutíferas, direcionando esforços de estudos para alternativas mais eficazes.

### **3. OBJETIVO**

Este estudo teve como principal objetivo analisar a toxicidade da mitoxantrona sobre as linhagens celulares de carcinoma e adenocarcinoma esofágico (Tabela 9) com intuito de classificá-las quanto à responsividade ao tratamento: responsivas ou não responsivas.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. CULTURA CELULAR

Todas as células de câncer de esôfago ESCC (TE-1, TE-7, TE-8, TE-10, TE-13), EAC (FLO-1, SK-GT-4, OACP6A, JK-ESOAD1; OE33; ESO26) e as células esofágicas normal (EPC2) foram cultivadas em meios específicos contendo com penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) e submetidas a análises para detecção de micoplasma através da técnica de *short tandem repeat* (STR)- PCR, conforme as diretrizes estabelecidas pela GATC Biotech (Konstanz, Alemanha). As células foram incubadas em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C.

Os detalhes sobre o meio de cultura, bem como da suplementação específica para cada linhagem celular estão discriminados na Tabela 10.

**Tabela 10. Especificações detalhadas dos meios de cultura associados a cada linhagem.**

	ESCC		EAC	CÉLULA ESOFÁGICA NORMAL
<b>LINHAGEM CELULAR</b>	TE-1; TE-7; TE-8; TE-10; TE-13	FLO-1; SK-GT- 4; OACP6A; JK-ESOAD1	OE33; ESO26	EPC2
<b>MEIO DE CULTURA</b>	RPMI 1640 + 10% SFB	RPMI 1640 + 10% SFB	RPMI 1640 + 2µM GlutaMAX (100X)	Keratinocyte-SFM + rEGF + BPE

ESCC = esophageal squamous cell carcinoma (carcinoma de células escamosas esofágico); EAC = esophageal adenocarcinoma (adenocarcinoma esofágico); SFM = serum-free medium (meio sem soro); rEGF = recombinant epidermal growth factor (fator de crescimento epidérmico recombinante); BPE = bovine pituitary extract (extrato de hipófise bovina)

### 4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA E DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Todas as linhagens celulares ESCC e EAC foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade  $1 \times 10^4$  células/poço. Após 24h, a MTX foi administrada nas concentrações 0, 0,5, 1, 2, 3 e 5µM e o tratamento mantido por 24h. Durante o período de tratamento as células foram mantidas em estufa à 37°C, 85% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. As análises foram realizadas nos períodos de 24 e 48 horas após o início do tratamento.

As imagens foram capturadas usando microscópio da Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA) através do programa *CaptureSoftware: EVOS Software Revision 26133* na magnitude de 10x. Em seguida, as células foram analisadas em sua morfologia e quantidade.

#### **4.3. ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR PELA REDUÇÃO DO MTT**

Todas as linhagens celulares ESCC e EAC foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade  $1 \times 10^4$  células/poço. Após 24h, MTX foi administrada nas concentrações 0, 0.5, 1, 2, 3 e  $5 \mu\text{M}$  e o tratamento mantido por 24 e 48h a  $37^\circ\text{C}$ , 85% de umidade e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, foi acrescentado aos meios de cultura específico para cada linhagem  $20 \mu\text{L}$  de MTT ( $0,5 \text{mg/mL}$ ) diluído em PBS e as células incubadas por 3h. Todo o meio contendo MTT foi removido cuidadosamente e, para dissolver os cristais de formazan produzidos (produto da redução do MTT pelas enzimas desidrogenases, principalmente mitocondriais) adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  de DMSO e imediatamente a placa foi inserida no leitor de microplacas e, para melhor diluição a placa foi agitada por 2min (modo orbital, amplitude 1mm à  $22.3^\circ\text{C}$ ). Finalmente, a absorbância foi medida a  $\lambda = 570 \text{nm}$  pelo software Tecan i-control 2.0.10.0 e a viabilidade celular foi calculada em porcentagem, comparando as células tratadas com as células controle.

#### **4.4. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR**

Em placas de 24 poços, adicionou-se  $10 \mu\text{L}$ /poço de MTX nas seguintes concentrações: 0, 2 e  $5 \mu\text{M}$  para ambas as linhagens celulares TE-7 (ESCC) e JK-ESOA1 (EAC), em seguida, as células foram plaqueadas na densidade de  $8 \times 10^4$ . Após o período de adesão,  $\sim 12 \text{h}$ , o meio de cultura contendo a MTX foi removido, as células foram lavadas 1x com PBS, em temperatura ambiente, e incubadas por 1h com o cristal violeta ( $0.5 \text{g}$  diluído em solução contendo  $50 \text{mL}$  de metanol e de  $50 \text{mL}$  de água MilliQ). Posteriormente, as células foram lavadas novamente 2x com PBS e as placas deixadas para secagem ao ar, em ambiente estéril.

As imagens foram, então, capturadas usando microscópio da Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA) através do programa *CaptureSoftware: EVOS Software*

*Revision 26133* na magnitude de 10x. Em seguida, para dissolver cristal violeta, adicionou-se 100 $\mu$ L de metanol e imediatamente a placa foi inserida no leitor de microplacas. Para melhor diluição a placa foi agitada por 30s (modo orbital, amplitude 1mm à 22.3°C). Finalmente, a absorbância foi medida a  $\lambda = 540\text{nm}$  pelo software Tecan i-control 2.0.10.0 e a adesão celular foi calculada em Unidades Arbitrárias, comparando as células tratadas com as células controle.  $n_{\text{experimental}} = 3$ .

#### 4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste T (bilateral, não pareado e score de erro de 0,05) e análise de variância de One-way ANOVA seguida pelo teste pós-hoc de Tukey com medida de erro padrão  $\pm$  e valor de  $p < 0,05$  foram realizados para a elaboração dos gráficos utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, USA).

## 5. RESULTADOS

Durante o desenvolvimento do projeto de mestrado tive a oportunidade de fazer um estágio no *Erasmus Medical Center - EMC (University of Rotterdam)* sob a orientação da Profa. Gwenny Fuhler. O *EMC* destaca-se como centro de referência no tratamento do câncer de esôfago, com especial ênfase no subtipo ESCC. A instituição realiza coletas de dados clínicos e patológicos de todos os pacientes, os quais são posteriormente armazenados em um banco de dados. Durante o estágio nesse centro médico, pude contribuir ativamente para essa coleta, participando especificamente da triagem farmacológica com o objetivo de rastrear a resposta das células de EC à MTX.

### 5.1. Impacto da mitoxantrona nas linhagens celulares ESCC e EAC.

Como é possível ver na Tabela 11, as análises dos resultados revelam padrões distintos de resposta das linhagens celulares ESCC (TE-7, TE-8, TE-10, TE-13) e EAC (FLO-1, OE33, ESO26, JH-ESOAD1) frente ao tratamento com a MTX.

**TE-7:** a viabilidade celular desta linhagem diminui de forma significativa em 24h, evidenciando a sensibilidade ao tratamento. Em 48h, a redução da viabilidade persiste, destacando a eficácia da MTX (Figura 16A, B). Na maior concentração de MTX (10 $\mu$ M), é possível ver a perda da proliferação celular.

**TE-8:** esta célula mostra alta suscetibilidade à MTX, com queda expressiva na viabilidade em 24h, especialmente em dosagens mais elevadas; IC<sub>50</sub> alcançado na dosagem de 3 $\mu$ M (Figura 16C). A morfologia da célula é alterada para um formato "estrelar", além de muitas células adquirem uma morfologia que sugere inatividade ou morte celular, manifestando-se como células redondas e soltas (Figura 16D).

**TE-10:** em 24h de exposição à MTX, a TE-10 demonstra uma discreta queda na viabilidade celular, indicando uma resposta inicial ao quimioterápico. Embora essa redução não seja tão pronunciada quanto nas outras linhagens ESCC, a observação de uma diminuição dose-dependente na viabilidade sugerindo que a TE-10 pode responder de maneira mais eficaz a dosagens mais altas da MTX. Após 48h de tratamento, a quantidade de células diminui conforme o aumento da dosagem, indicando um impacto direto na proliferação celular. Esse fenômeno é mais evidente na dosagem de 10 $\mu$ M, onde ocorre também uma alteração no padrão da proliferação celular (Figura 16E, F).

Tabela 11. Efeito da mitoxantrona sobre as células derivadas de carcinoma e adenocarcinoma esofágico.

		ESCC					EAC		
		IC <sub>50</sub>	VIABILIDADE CELULAR	REDUÇÃO NO n° DE CÉLULAS			IC <sub>50</sub>	VIABILIDADE CELULAR	REDUÇÃO NO n° DE CÉLULAS
TE-7	24h	5µM	↓ significativa	sim (significativa)	FLO-1	24h	não atingiu	houve ↓	sim
	48h	2µM	↓ expressiva quando comparada a 24h	sim, mantendo a progressão com 24h		48h	3µM	progressão do decaimento	sim, mantendo a progressão com 24h
TE-8	24h	3µM	↓ significativa	sim (significativa)	OE33	24h	não atingiu	houve ↓	não
	48h	não atingiu	progressão do decaimento	sim, mantendo a progressão com 24h		48h	não atingiu	progressão do decaimento similar ao de 24h	não
TE-10	24h	não atingiu	não houve ↓ significativa	sim	ESO26	24h	5µM	↓ dose-dependente	sim (significativa)
	48h	2µM	↓ expressiva quando comparada a 24h	sim, mantendo a progressão com 24h		48h	2µM	↓ expressiva quando comparada a 24h	sim, mantendo a progressão com 24h
TE-13	24h	não atingiu	aumento expressivo	sim	JH-ESOAD1	24h	não atingiu	não houve ↓ significativa	não
	48h	10µM	↓ significativa quando comparada a 24h	sim, mantendo a progressão com 24h		48h	similar aos achados de 24h		

IC<sub>50</sub> = Concentração Inibitória 50%; ↓ = diminuída(o)

**TE-13:** a linhagem celular TE-13 revela uma resposta única e complexa à exposição da MTX. Ao observar o período de 24h, TE-13 destaca-se pela elevada redução do MTT, sugerindo uma resposta metabólica específica (Figura 16G). Essa peculiaridade pode indicar uma adaptação rápida, possivelmente relacionada a uma intensificação na fosforilação oxidativa, como parte da resposta celular ao quimioterápico. Em contrapartida, é notório que a MTX promove uma significativa diminuição na quantidade de células; presença de células em ilhas, com perda de contato entre elas afetando a interação célula-célula (Figura 16H). Essa alteração, associada à diminuição na quantidade celular, sugere que a MTX não apenas afeta a proliferação, mas também interfere na arquitetura e na coesão das células TE-13. Somente após 48h, na maior dosagem, a MTX atinge o  $IC_{50}$ . Essa observação sugere que a TE-13 pode requerer dosagens mais elevadas para alcançar uma resposta terapêutica. Apesar dessa necessidade, a quantidade de células continua a diminuir de forma expressiva, indicando uma ação antiproliferativa persistente da MTX.

**FLO-1 e OE33** mostram respostas semelhantes ao MTT, com diminuição da viabilidade conforme a concentração de MTX aumenta (Figura 17A, C). A eficácia é notável mesmo em doses menores, evidenciando a sensibilidade dessas linhagens ao tratamento. Intrigantemente, a linhagem FLO-1, na maior dosagem, a quantidade de células de FLO-1 diminui drasticamente, chegando a quase nenhuma célula no poço. Essa resposta sugere uma ação intensiva da MTX na inibição da proliferação celular, culminando em uma notável diminuição na densidade celular. Ademais, as células tratadas adquirem uma morfologia mais alongada e fusiforme, contrastando com as células controle (Figura 17B).

**ESO26:** essa linhagem é altamente suscetível à MTX (Figura 17E, F). Em um curto período de tratamento (24h), a resposta das células ao tratamento é extraordinariamente eficaz, atingindo seu  $IC_{50}$  nas maiores dosagens (Figura 17E). Essa resposta indica um impacto significativo na viabilidade celular em um estágio inicial do tratamento. Ao estender o período de exposição para 48 horas, observa-se uma redução quase completa na viabilidade celular, sugerindo uma resposta persistente e duradoura da ESO-26.

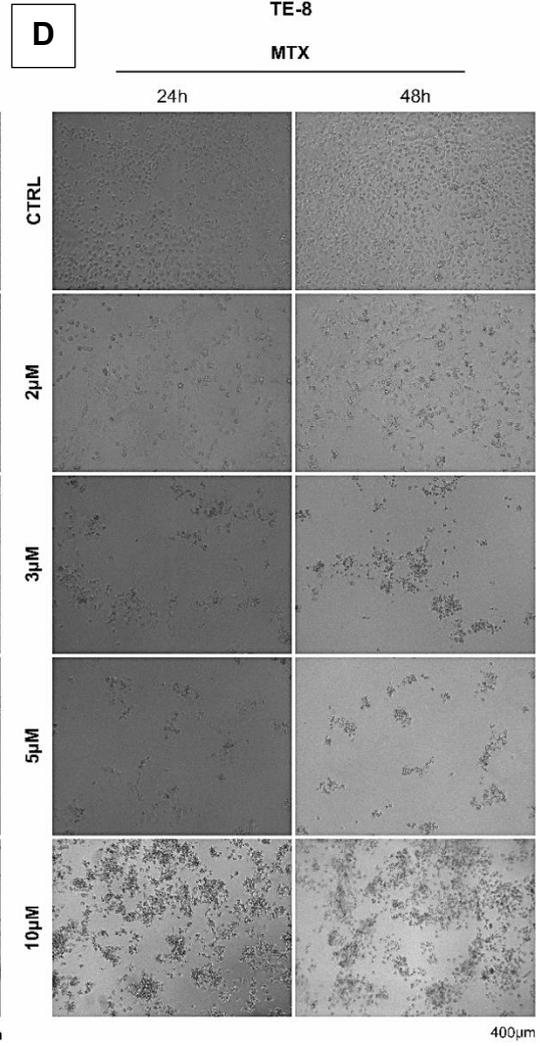
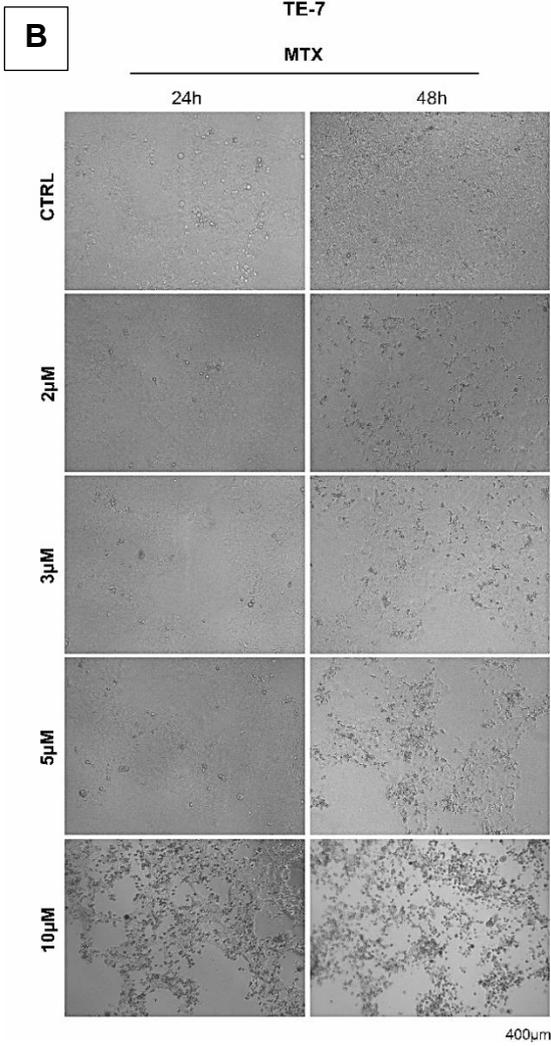
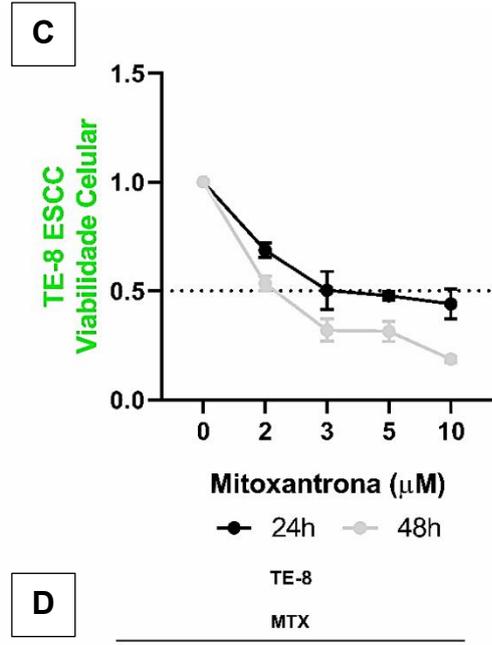
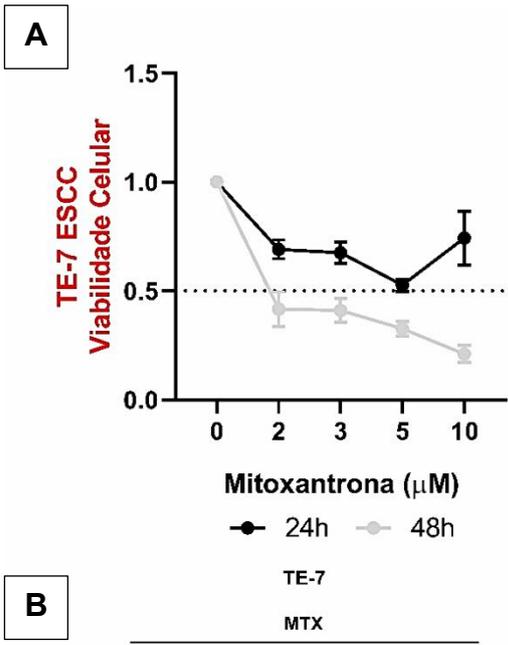
**JH-ESAd1:** em relação a viabilidade (MTT) parece não ser muito responsiva ao tratamento (Figura 18G). Ainda, a proliferação celular da JH-ESAd1 é afetada principalmente nas dosagens mais elevadas da MTX (Figura 18H). Esse padrão sugere que, apesar de seu impacto notável na taxa de proliferação, a célula JH-ESAd1 parece mostrar uma resistência relativa em comparação com outras linhagens celulares. Em contraste, sua adesão celular parece ser significativamente impactada pelo tratamento. Conforme a Figura 18, as células submetidas

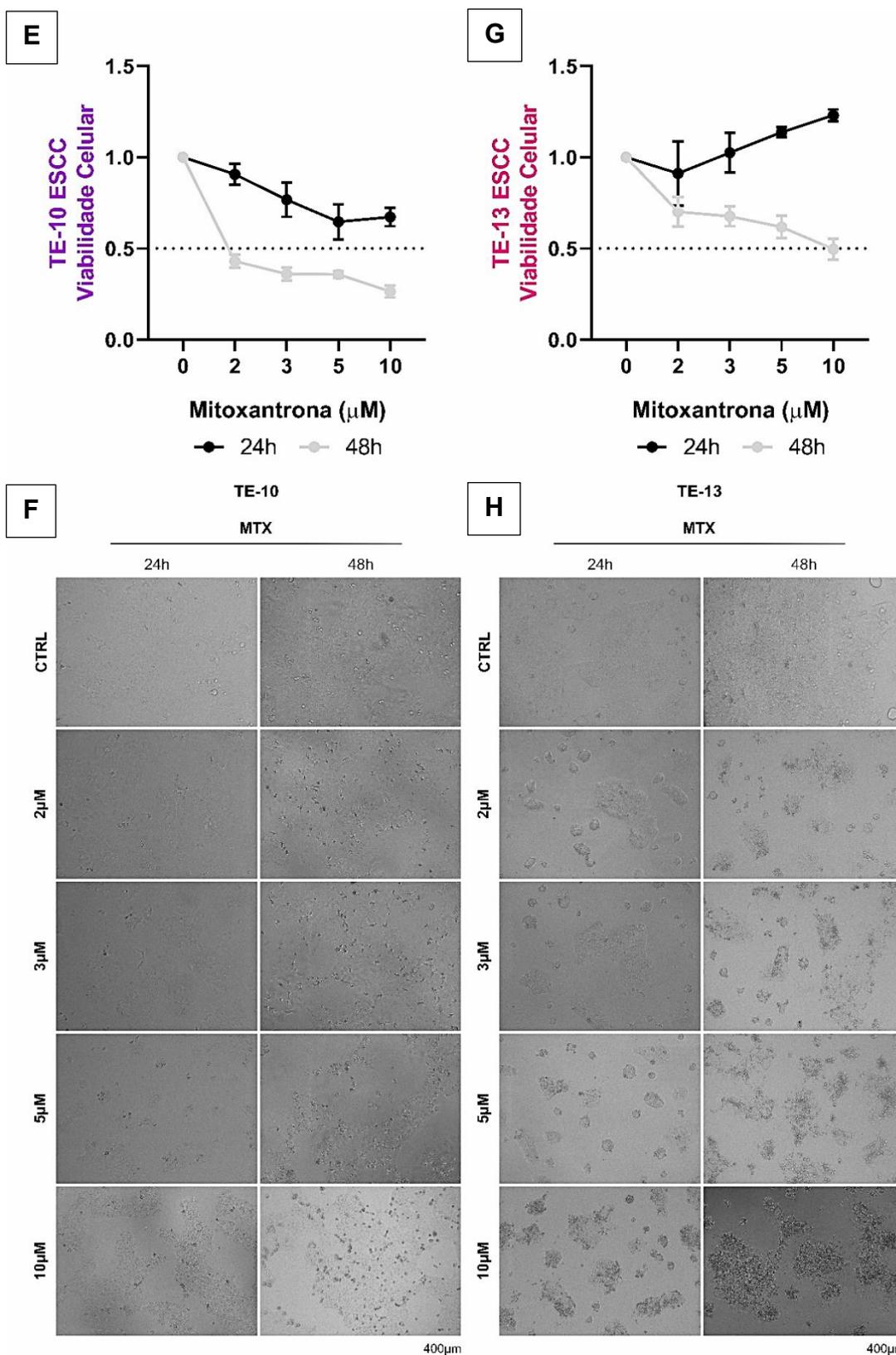
a MTX apresentam uma diminuição na quantidade de células aderidas à placa, evidenciando alterações na capacidade de adesão dessa linhagem. Ainda, quando comparada ao controle, essas células apresentam características notáveis em sua morfologia como uma forma mais arredondada e a presença de vacúolos citoplasma.

Em comparação com outras células EAC, a JH-ESAd1 se destaca por seu tamanho consideravelmente maior (Figura 18 e dados não publicados) o que pode explicar, em parte, por que as diferenças observadas na adesão celular não foram significativas estatisticamente. Esses achados apontam para nuances complexas na resposta da JH-ESAd1 ao tratamento com MTX, indicando uma resistência aparente na proliferação, mas ao mesmo tempo destacando alterações significativas na adesão celular e na morfologia. Essa dualidade de respostas pode abrir caminho para investigações mais aprofundadas sobre os mecanismos específicos subjacentes a essas características

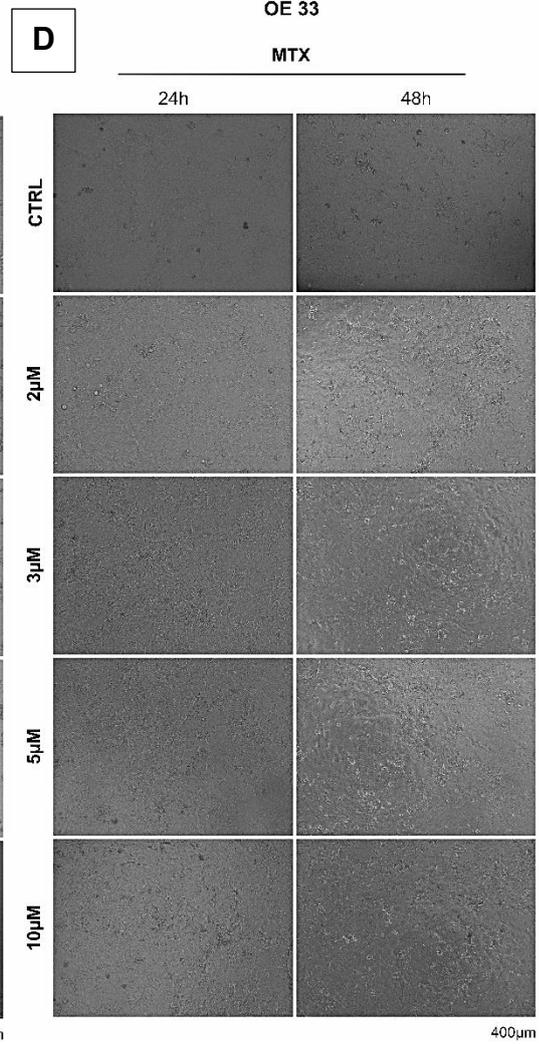
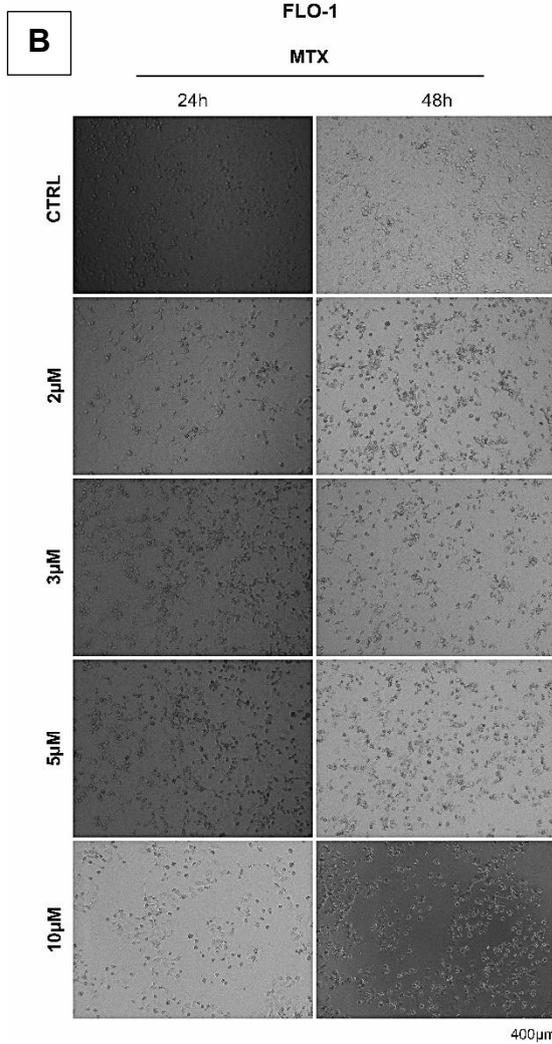
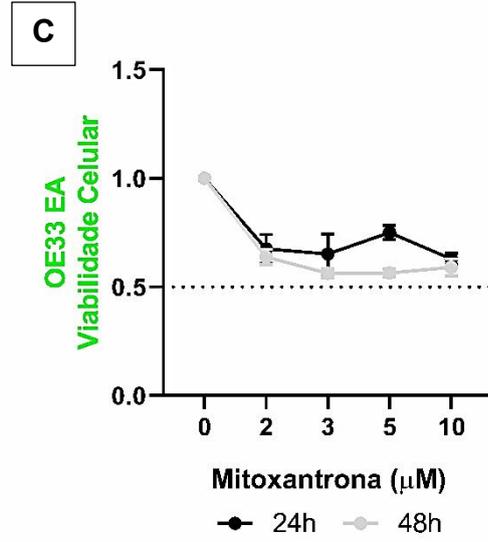
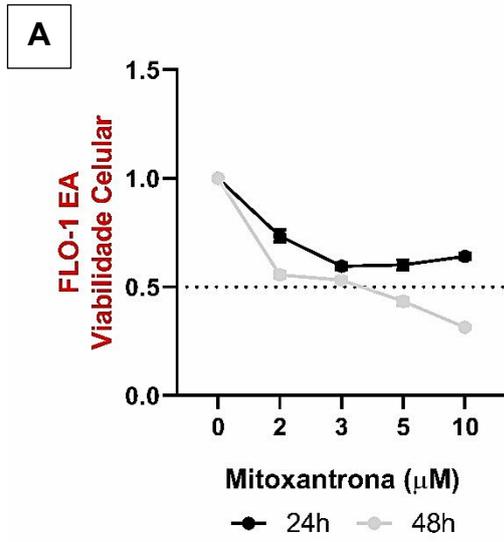
Paralelamente, a TE-7 também exibe uma significativa redução em sua capacidade de adesão quando exposta à MTX, conforme evidenciado pela Figura 18. Além disso, há uma diminuição na quantidade de células aderidas, corroborando as observações microscópicas (Figura 18B).

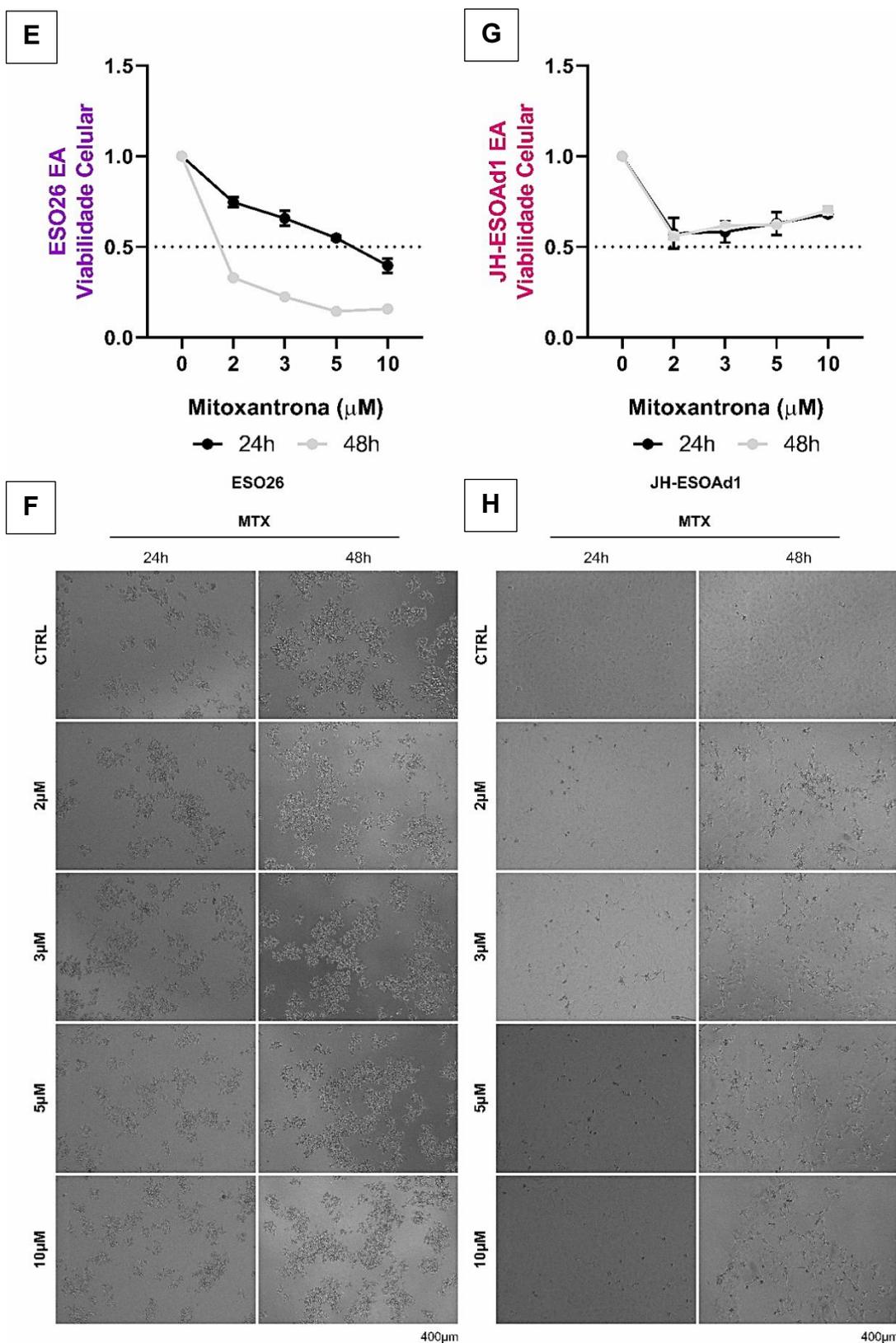
Em geral, as linhagens celulares de EAC demonstraram maior suscetibilidade à MTX.



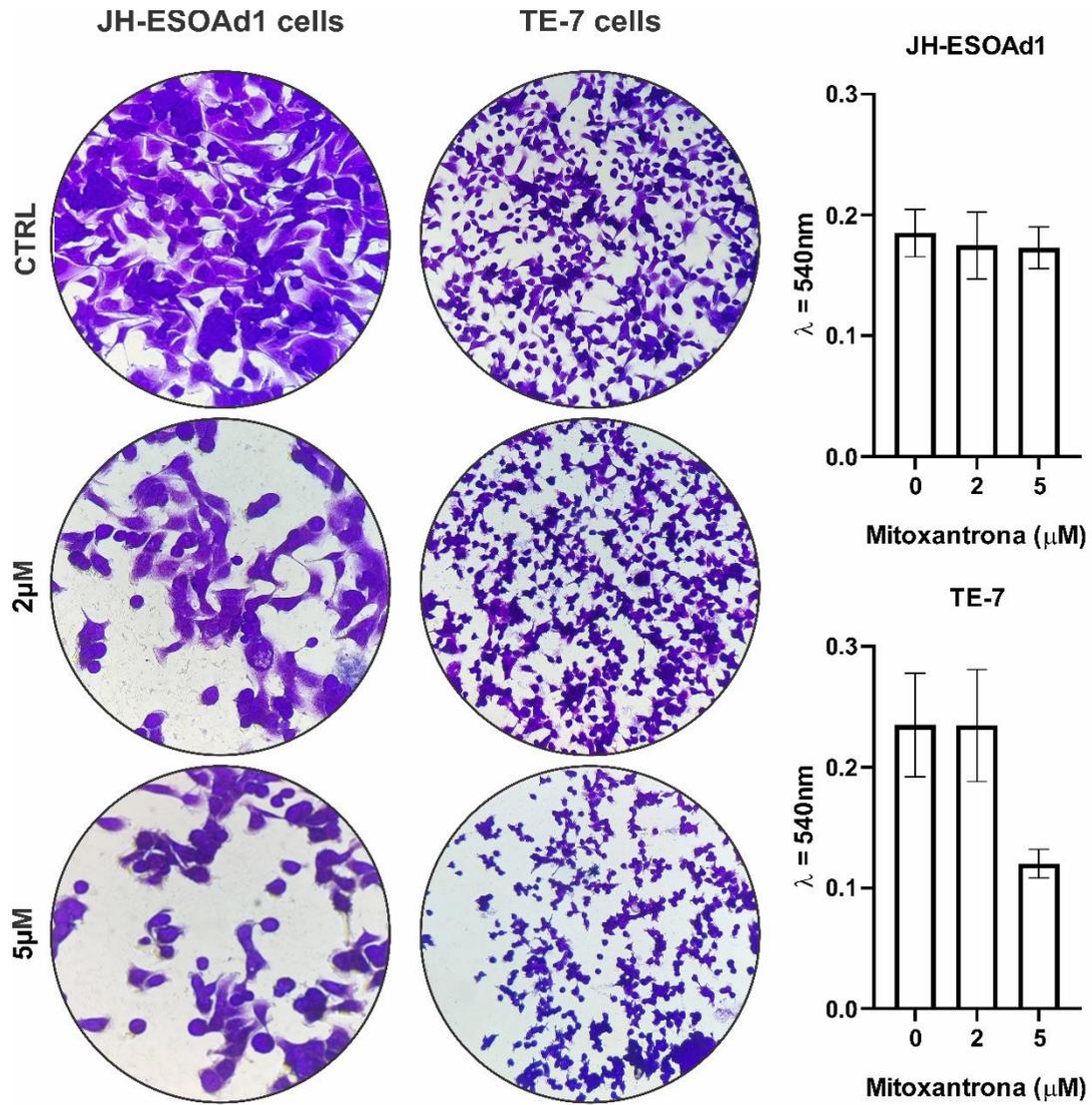


**Figura 16.** Efeito da mitoxantrona nas linhagens celulares ESCC TE-7, TE-8, TE-10 e TE-13. As respostas das células a diferentes concentrações de MTX, revelando padrões distintos de sensibilidade e comportamento frente ao tratamento. A análise inclui aspectos como viabilidade celular e proliferação, mostrando a eficácia e a especificidade da MTX em cada linhagem.





**Figura 17. Efeito da mitoxantrona nas linhagens celulares EAC FLO-1, OE33, ESO26 e JH-ESOAd1.** As respostas das células a diferentes concentrações de MTX, revelando padrões distintos de sensibilidade e comportamento frente ao tratamento. A análise inclui aspectos como viabilidade celular, morfologia e proliferação, fornecendo *insights* valiosos sobre a eficácia e a especificidade da MTX em cada linhagem



**Figura 18. Impacto da mitoxantrona na adesão das células JH-ESOAd1 e TE-7.** As células foram submetidas a condições específicas para avaliar sua capacidade de aderir a uma superfície, fornecendo informações cruciais sobre a interação celular e as características adesivas de cada linhagem.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos notar que a mitoxantrona apresenta uma ação antiproliferativa em células cancerígenas esofágicas, destacando-se, sobretudo, as células de carcinoma esofágico. Além disso, o tratamento interferiu de maneira significativa na adesão das células carcinoma TE-7 e adenocarcinoma JH-ESOAD1. Juntos, esses achados sugerem a mitoxantrona como um agente terapêutico potencialmente promissor para o câncer esofágico, particularmente no carcinoma. Contudo, ressalta-se a imprescindibilidade de estudos adicionais para a validação robusta desses resultados preliminares. Assim, a continuidade da investigação é crucial para elucidar detalhadamente os mecanismos de ação da mitoxantrona no câncer esofágico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNET, C. C.; ARNOLD, M.; WEI, W.-Q. Epidemiology of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology*, v. 154, n. 2, p. 360–373, jan. 2018.
- ANDRADE, A. M. L. C. DE et al. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DO CÂNCER DE ESÔFAGO NO BRASIL: UM ESTUDO DESCRITIVO. *ID on line REVISTA DE PSICOLOGIA*, v. 12, n. 40, p. 8, 10 mar. 2018.
- BOONSTRA, J. J. et al. Mapping of homozygous deletions in verified esophageal adenocarcinoma cell lines and xenografts. *Genes Chromosomes and Cancer*, v. 51, n. 3, 2012.
- DAKUBO, G. D. Esophageal Cancer Biomarkers in Circulation. Em: *Cancer Biomarkers in Body Fluids*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 147–178.
- GALIANA, C. et al. Possible role of activated ras genes in human esophageal carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, v. 54, n. 6, 1993.
- IGAKI, H. et al. Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 203, n. 2, 1994.
- INCA. Estimativa | 2023 Incidência de Câncer no Brasil. [s.l: s.n.].
- KAMANGAR, F. et al. The global, regional, and national burden of oesophageal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, v. 5, n. 6, p. 582–597, jun. 2020.
- LAGERGREN, J. et al. Oesophageal cancer. *The Lancet*, v. 390, n. 10110, p. 2383–2396, nov. 2017.
- LIU, Q. et al. MTS-1 (CDKN2) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene*, v. 10, n. 3, 1995.
- MUNARI, F. F. et al. Profile of esophageal squamous cell carcinoma mutations in Brazilian patients. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 20596, 18 out. 2021.
- REICHENBACH, Z. W. et al. Clinical and translational advances in esophageal squamous cell carcinoma. Em: *Advances in Cancer Research*. [s.l: s.n.]. v. 144.
- SHEIKH, M. et al. Current Status and Future Prospects for Esophageal Cancer. *Cancers*, 2023.
- SILVERTHORN, D. U. Sistema Digestório. Em: *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada*. 7. ed. Porto Alegre: artmed, 2017. p. 655–694.
- SMYTH, E. C. et al. Oesophageal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, n. 1, p. 17048, 27 jul. 2017.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

WANG, N. J. et al. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 43, 2011.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ABNET, C. C.; ARNOLD, M.; WEI, W.-Q. Epidemiology of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology*, v. 154, n. 2, p. 360–373, jan. 2018.
- AHMED, D. et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, v. 2, 2013.
- ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 2004.
- ALZAHIRANI, S. M.; AL DOGHAITHER, H. A.; AL-GHAFAR, A. B. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (review). *Molecular and Clinical Oncology*, v. 15, n. 6, 2021.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal Cancer Facts and Figure 2017-2019 Global Headquarters: American Cancer Society Inc. [s.l: s.n.].
- ANDRADE, A. M. L. C. DE et al. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DO CÂNCER DE ESÔFAGO NO BRASIL: UM ESTUDO DESCRITIVO. ID on line REVISTA DE PSICOLOGIA, v. 12, n. 40, p. 8, 10 mar. 2018.
- AOYAMA, H. et al. Proteínas tirosina fosfatases: Propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, 2003.
- BABU, M. S. et al. Lapachol inhibits glycolysis in cancer cells by targeting pyruvate kinase M2. *PLoS ONE*, 2018.
- BAHRAMI, A. et al. Targeting RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 2018a.
- BAHRAMI, A. et al. Therapeutic Potential of Targeting PI3K/AKT Pathway in Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 119, n. 3, 2018b.
- BARNES, T. A. et al. Efficacy, safety, tolerability and price of newly approved drugs in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*, 2017.
- BOONSTRA, J. J. et al. Mapping of homozygous deletions in verified esophageal adenocarcinoma cell lines and xenografts. *Genes Chromosomes and Cancer*, v. 51, n. 3, 2012.
- BRADLEY, C. A. CXCR4–HIF-1 $\alpha$  interaction drives metastasis. *Nature Reviews Urology*, v. 15, n. 12, p. 726–726, 12 dez. 2018.
- BRENNER, H.; CHEN, C. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *British Journal of Cancer*, 2018.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2013.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2005.
- CHATZINIKOLAIDOU, M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug Discovery Today*, 2016.

- CHENG, H. C. et al. Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme Research*, 2011.
- CHIAL, B. H. et al. Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. *Nature Education*, v. 1, n. 2008, 2008.
- CLERICI, S. P. et al. Colorectal Cancer Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Educate Human Fibroblasts to Stimulate Migratory Capacity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, 2021.
- CUKIERMAN, E. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, v. 294, n. 5547, p. 1708–1712, 23 nov. 2001.
- DAKUBO, G. D. Esophageal Cancer Biomarkers in Circulation. Em: *Cancer Biomarkers in Body Fluids*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 147–178.
- DEAVALL, D. G. et al. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology*, 2012.
- DIETEL, M. et al. Effectiveness of mitoxantrone on the proliferation of cell cultures derived from malignant mesenchymal tumors of human origin. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 114, n. 2, p. 197–203, abr. 1988.
- EVISON, B. J. et al. Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison. *Medicinal research reviews*, v. 36, n. 2, p. 248–99, mar. 2016.
- FARIA, A. V. S. et al. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase as signaling hub of cancer hallmarks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021.
- FARIA, A. V. S. et al. Oncophosphosignaling Favors a Glycolytic Phenotype in Human Drug Resistant Leukemia. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 118, n. 11, p. 3846–3854, nov. 2017.
- FARIA, A. V. S. et al. Platelet-dependent signaling and Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase expression promote aggressive phenotypic changes in gastrointestinal cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1868, n. 1, 2022.
- FARIA, A. V. S. et al. Violacein switches off low molecular weight tyrosine phosphatase and rewires mitochondria in colorectal cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, v. 127, 2022.
- FERREIRA, P. A. et al. Knocking Down Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase (LMW-PTP) Reverts Chemoresistance through Inactivation of Src and Bcr-Abl Proteins. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.
- FERREIRA-HALDER, C. V. et al. Protein Tyrosine Phosphatases in Tumor Progression and Metastasis: Promoter or Protection? Em: *ELSIVIER (Ed.). Tumor Progression and Metastasis*. 1. ed. [s.l.] IntechOpen, 2020. p. 411–445.
- FILIPP, F. Cancer metabolism meets systems biology: Pyruvate kinase isoform PKM2 is a metabolic master regulator. *Journal of Carcinogenesis*, v. 12, n. 1, p. 14, 2013.
- GALIANA, C. et al. Possible role of activated ras genes in human esophageal carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, v. 54, n. 6, 1993.
- GRIFFIN, C. et al. Pancreatistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 10, n. 1, 2011.

- GRIMES, D. R.; FLETCHER, A. G.; PARTRIDGE, M. Oxygen consumption dynamics in steady-state tumour models. *Royal Society Open Science*, v. 1, n. 1, 2014.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000.
- HARVEY, A. J. Overview of Cell Signaling Pathways in Cancer. Em: Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine. [s.l: s.n.].
- HAUSMAN, D. M. What is cancer? *Perspectives in Biology and Medicine*, v. 62, n. 4, 2019.
- HAWKINS, P. C. D. et al. Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and cambridge structural database. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2010.
- HAWKINS, P. C. D.; NICHOLLS, A. Conformer generation with OMEGA: Learning from the data set and the analysis of failures. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012.
- HE, R. J. et al. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica* 2014 35:10, v. 35, n. 10, p. 1227–1246, 15 set. 2014.
- HIRSCHHAEUSER, F.; SATTTLER, U. G. A.; MUELLER-KLIESER, W. Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Research*, 2011.
- HIRSCHHAEUSER, F.; SATTTLER, U. G. A.; MUELLER-KLIESER, W. Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Research*, 2011.
- HÖCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001.
- HOEKSTRA, E. et al. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMWPTP) upregulation mediates malignant potential in colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 8300–8312, 2015.
- HORNUNG, A. et al. Treatment efficiency of free and nanoparticle-loaded mitoxantrone for magnetic drug targeting in multicellular tumor spheroids. *Molecules*, v. 20, n. 10, 2015.
- HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*, 2014.
- HOWLADER, N. et al. SEER cancer statistics review. National Cancer Institute, p. 1975-2010, 2013.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 1995.
- IGAKI, H. et al. Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 203, n. 2, 1994.
- INCA. Estimativa | 2023 Incidência de Câncer no Brasil. [s.l: s.n.].
- IQBAL, M. A. et al. Missense Mutations in Pyruvate Kinase M2 Promote Cancer Metabolism, Oxidative Endurance, Anchorage Independence, and Tumor Growth in a Dominant Negative Manner. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 12, p. 8098–8105, 21 mar. 2014.

- JIN, L. et al. Phosphorylation-mediated activation of LDHA promotes cancer cell invasion and tumour metastasis. *Oncogene*, v. 36, n. 27, 2017.
- JOHNSON, C. M. et al. Meta-Analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes and Control*, v. 24, n. 6, 2013.
- JONES, S. et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 11, 2008.
- KAMANGAR, F. et al. The global, regional, and national burden of oesophageal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, v. 5, n. 6, p. 582–597, jun. 2020.
- KATONA, B. W.; LYNCH, J. P. *Mechanisms of Gastrointestinal Malignancies*. Em: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Sixth Edition. [s.l: s.n.]. v. 2.
- KOBAYASHI, H. et al. Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 16, n. 5, p. 282–295, 1 maio 2019.
- KRASIN, M. J.; DAVIDOFF, A. M. *Principles of Pediatric Oncology, Genetics of Cancer, and Radiation Therapy*. Em: *Pediatric Surgery: Sixth Edition*. [s.l: s.n.]. v. 1–2.
- KUIPERS, E. J. et al. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers* 2015 1:1, v. 1, n. 1, p. 1–25, 5 nov. 2015.
- LACZMANSKA, I.; SASIADEK, M. M. Tyrosine phosphatases as a superfamily of tumor suppressors in colorectal cancer. *Acta biochimica Polonica*, v. 58, n. 4, p. 467–70, 2011.
- LAGERGREN, J. et al. Oesophageal cancer. *The Lancet*, v. 390, n. 10110, p. 2383–2396, nov. 2017.
- LANDYS, K. et al. Mitoxantrone as a first-line treatment of advanced breast cancer. *Investigational New Drugs*, v. 3, n. 2, 1985.
- LE, A. et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 5, p. 2037–2042, 2 fev. 2010.
- LEE, S.-Y.; BISSELL, M. A Functionally Robust Phenotypic Screen that Identifies Drug Resistance-associated Genes Using 3D Cell Culture. *BIO-PROTOCOL*, v. 8, n. 22, 2018.
- LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, v. 41, n. 3, p. 211–218, mar. 2016.
- LIN, C. et al. Role of gut microbiota in the development and treatment of colorectal cancer. *Digestion*, 2019.
- LINCET, H.; ICARD, P. How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? *Oncogene*, 2015.
- LIU, Q. et al. MTS-1 (CDKN2) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene*, v. 10, n. 3, 1995.

- LIU, Y.; BODMER, W. F. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 4, 2006.
- LONGATI, P. et al. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer*, v. 13, 2013.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*, 2012.
- LUO, W.; SEMENZA, G. L. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, v. 23, n. 11, p. 560–6, nov. 2012.
- MALENTACCHI, F. et al. Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 334, n. 3, 2005.
- MARKOWITZ, S. D.; BERTAGNOLLI, M. M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 2009.
- MARLEY, A. R.; NAN, H. Epidemiology of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 2016.
- MAZURE, N. M. VDAC in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1858, n. 8, p. 665–673, 2017.
- MCGANN, M. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011.
- MCGANN, M. R. et al. Gaussian docking functions. *Biopolymers*, v. 68, n. 1, p. 76–90, jan. 2003.
- MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, v. 164, n. 2, 2012.
- MENSHYKAU, D. Emerging technologies for prediction of drug candidate efficacy in the preclinical pipeline. *Drug Discovery Today*, 2017.
- MILANI, R.; FERREIRA, C. V.; GRANJEIRO, J. M.; PAREDES-GAMERO, E. J.; SILVA, R. A.; JUSTO, G. Z.; NADER, H. B.; GALEMBECK, E.; PEPPELENBOSCH, M. P.; AOYAMA, H.; ZAMBUZZI, W. F. Phosphoproteome Reveals an Atlas of Protein Signaling Networks During Osteoblast Adhesion. *Journal of Cellular Biochemistry (Print)*, v. 109, p. 957-966, 2010.
- MIMEAULT, M. et al. Improvement of cytotoxic effects induced by mitoxantrone on hormone-refractory metastatic prostate cancer cells by co-targeting epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling cascades. *Growth Factors*, v. 25, n. 6, 2007.
- MORÁN, A. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, v. 2, n. 3, 2010.
- MOREIRA, A. F.; DIAS, D. R.; CORREIA, I. J. Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2016.
- MOURADOV, D. et al. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Research*, v. 74, n. 12, 2014.

- MUNARI, F. F. et al. Profile of esophageal squamous cell carcinoma mutations in Brazilian patients. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 20596, 18 out. 2021.
- NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics*, 2016.
- NERVI, C.; DE MARINIS, E.; CODACCI-PISANELLI, G. Epigenetic treatment of solid tumours: A review of clinical trials. *Clinical Epigenetics*, 2015.
- NIU, N.; WANG, L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics*, 2015.
- NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 5, n. 3, p. 239–248, 16 ago. 2011.
- OGINO, S. et al. Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: An emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut*, 2011.
- OKI, E. et al. 6 Circulating Cancer Cells. Em: *Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas*. [s.l: s.n.]. v. 4.
- OLIVEIRA, P. F. DE S. VIOLACEÍNA DESLIGA A SINALIZAÇÃO DEPENDENTE DOS RECEPTORES TIROSINA QUINASES (AXL E EGFR) EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL (HT29). [s.l: s.n.].
- PADUCH, R. Theories of cancer origin. *European Journal of Cancer Prevention*, v. 24, n. 1, p. 57–67, jan. 2015.
- PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007.
- POURHOSEINGHOLI, M. A.; VAHEDI, M.; BAGHESTANI, A. R. Burden of gastrointestinal cancer in Asia; an overview. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 2015.
- QIN, J. et al. Vaccination with mitoxantrone-treated primary colon cancer cells enhances tumor-infiltrating lymphocytes and clinical responses in colorectal liver metastases. *Journal of Surgical Research*, v. 233, p. 57–64, 2019.
- REICHENBACH, Z. W. et al. Clinical and translational advances in esophageal squamous cell carcinoma. Em: *Advances in Cancer Research*. [s.l: s.n.]. v. 144.
- ROHWER, N.; CRAMER, T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resistance Updates*, v. 14, n. 3, 2011.
- RUELA-DE-SOUSA, R. R. et al. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase predicts prostate cancer outcome by increasing the metastatic potential. *European Urology*, 2016.
- SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.
- SCOTT, L. J.; FIGGITT, D. P. Mitoxantrone: A review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs*, 2004.
- SEMENZA, G. L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Journal*, 2007.

- SHEIKH, M. et al. Current Status and Future Prospects for Esophageal Cancer. *Cancers*, 2023.
- SIDDIQUI, F. A. et al. Curcumin decreases Warburg effect in cancer cells by down-regulating pyruvate kinase M2 via mTOR-HIF1 $\alpha$  inhibition. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 8323, 29 dez. 2018.
- SILVA, M.; ERRANTE, P. R. Câncer colorretal: fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 13, n. 33, 2017.
- SILVERTHORN, D. U. Sistema Digestório. Em: *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada*. 7. ed. Porto Alegre: artmed, 2017. p. 655–694.
- SMYTH, E. C. et al. Oesophageal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, n. 1, p. 17048, 27 jul. 2017.
- SOCIETY, A. C. Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016. *Colorectal Cancer Facts and Figures*, 2014.
- SOUZA, A. C. S. et al. From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 7, p. 1140–1153, 11 abr. 2009.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.
- TAMADA, M.; SUEMATSU, M.; SAYA, H. Pyruvate kinase M2: Multiple faces for conferring benefits on cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 2012.
- TOH, Y. M.; LI, T. K. Mitoxantrone inhibits HIF-1 $\alpha$  expression in a topoisomerase II-independent pathway. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 15, p. 5026–5037, 2011.
- TOMMELEIN, J. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Connect Metastasis-Promoting Communication in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 5, n. March, p. 1–11, 2015.
- TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006.
- TRÉDAN, O. et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007.
- URBAŃSKA, K.; ORZECZOWSKI, A. Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019.
- VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.
- WANG, D. K. et al. Targeted Immunotherapies in Gastrointestinal Cancer: From Molecular Mechanisms to Implications. *Frontiers in Immunology*, 2021.
- WANG, H. et al. Effect of HK2, PKM2 and LDHA on Cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer. *Oncology Letters*, 8 fev. 2018.

WANG, N. J. et al. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 43, 2011.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956.

WARBURG, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*, v. 9, n. 1, p. 148–163, 1 mar. 1925.

WARE, M. J. et al. Generation of an in vitro 3D PDAC stroma rich spheroid model. *Biomaterials*, v. 108, 2016.

WIGERUP, C.; PÅHLMAN, S.; BEXELL, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 2016.

YANG, H. et al. Review roles of GLUT-1 and HK-II expression in the biological behavior of head and neck cancer. *Oncotarget*, v. 10, n. 32, p. 3066–3083, 2019.

YANG, Y. et al. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*, v. 5, n. 23, p. 11886–11896, 15 dez. 2014.

ZHU, W. et al. The molecular mechanism and clinical significance of LDHA in HER2-mediated progression of gastric cancer. *American Journal of Translational Research*, v. 10, n. 7, 2018.

ZIPS, D.; THAMES, H. D.; BAUMANN, M. New anticancer agents: In vitro and in vivo evaluation. *In Vivo*, 2005.

## ANEXO I

## DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E/OU BIOSSEGURANÇA



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



## DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**MITOXANTRONA MODULA HALLMARKS DO CÂNCER COLORRETAL: EFEITO WARBURG E PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BAIXO PESO MOLECULAR (LMWPTP)**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Documento assinado digitalmente

gov.br

ALINE ELIDE DA SILVA BARBOSA  
Data: 05/04/2024 14:40:48-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) aluno(a): Aline Elide da Silva Barbosa

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): Carmen Veríssima Ferreira Halder

Data: 05/04/2024

**ANEXO II****DECLARAÇÃO DOS 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 **MITOXANTRONA MODULA HALLMARKS DO CÂNCER COLORRETAL: EFEITO WARBURG E PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BAIXO PESO MOLECULAR (LMWPTP)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 05 de Abril de 2024

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ALINE ELIDE DA SILVA BARBOSA  
Data: 05/04/2024 14:40:48-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) autor(a): **Aline Elide da Silva Barbosa**  
RG n.º 53.206.262-0

Assinatura : \_\_\_\_\_

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