

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Juliana Macedo dos Santos
Lara de Sousa Nunes

EFEITOS MEDIADOS POR PLAQUETAS NA METÁSTASE

São Paulo
2023

Juliana Macedo dos Santos

Lara de Sousa Nunes

EFEITOS MEDIADOS POR PLAQUETAS NA METÁSTASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof.^a Msa. Patrícia Aparecida Ferreira de Oliveira como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Juliana Macedo dos

Efeitos mediados por plaquetas na metástase / Juliana Macedo dos Santos, Lara de Sousa Nunes. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

72 p.

Orientação de Patrícia Aparecida Ferreira de Oliveira.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Agregação plaquetária 2. Ativação plaquetária 3. Metástase neoplásica
4. Neoplasias 5. Plaquetas I. Nunes, Lara de Sousa II. Oliveira, Patrícia
Aparecida Ferreira de III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 616.994

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

**Juliana Macedo dos Santos
Lara de Sousa Nunes**

EFEITOS MEDIADOS POR PLAQUETAS NA METÁSTASE

Prof.^a Msa. Patrícia Aparecida Ferreira de Oliveira

Profa. Dra. Juliana Vieira dos Santos Bianchi

Profa. Msa. Andreza Oliveira dos Santos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaríamos de agradecer aos nossos pais, que sempre incentivaram e apoiaram os nossos estudos e por terem nos sustentado ao longo de nossa vida inteira para que pudéssemos nos formar.

Agradecemos ainda nossas amigas, por oferecerem um ombro amigo e boas risadas para tornar o caminho mais leve e ainda serem nossos amigos, apesar de todos os convites negados ao longo desse último ano, por estarmos fazendo o TCC.

Temos também enorme gratidão por todos os nossos professores da graduação que se dedicaram ao máximo, mesmo nos anos da pandemia, para que tivéssemos uma formação sólida e de qualidade.

Em especial, gostaríamos de agradecer nossa orientadora Prof. Msa. Patrícia Aparecida Ferreira de Oliveira, não somos capazes de expressar suficiente gratidão a você, pelo seu empenho, paciência e simpatia ao longo do processo de construção do nosso trabalho e por ter nos acalmado nos nossos momentos de desespero.

Por último, mas não menos importante, agradecemos uma à outra pela nossa dedicação, compreensão, comprometimento e parceria nesse último ano inteiro para que o resultado do nosso trabalho fosse o melhor possível.

RESUMO

O câncer corresponde a segunda principal causa de morte na maioria dos países e com o envelhecimento populacional prevê-se que sua incidência aumente ainda mais. Trata-se de uma doença heterogênea, na qual fatores individuais, incluindo a predisposição genética, bem como fatores ambientais contribuem para o seu desenvolvimento. Nas últimas décadas, houve avanços na prevenção e detecção da doença e embora novas terapias tenham melhorado as opções de tratamento para câncer localizado, que muitas vezes pode ser curado com cirurgia local ou radiação, a metástase, uma doença sistêmica, tem sido a principal razão de falha terapêutica. A metástase é um processo altamente coordenado e dinâmico de várias etapas, na qual a interação das células tumorais com células do microambiente do hospedeiro é determinante para o estabelecimento bem-sucedido do nicho metastático. Nesse cenário, evidências sugerem haver uma estreita comunicação cruzada entre células tumorais e plaquetas que auxiliam células tumorais na conclusão de várias etapas da cascata metastática. Alterações hemostáticas em pacientes com tumores sólidos são frequentemente observadas na área clínica. A interação entre células tumorais e plaquetas pode ocorrer de maneira direta por moléculas ligadas a membrana ou liberação de mediadores solúveis, ou de maneira indireta através da geração de um nicho pró-trombótico, de maneira geral induzindo ativação plaquetária. Essa ativação plaquetária aberrante confere vantagens para a progressão metastática por diferentes mecanismos. A secreção plaquetária desencadeia a liberação de moléculas pró-angiogênicas que auxiliam no crescimento do tumor e transmigração de células tumorais. Durante o processo metastático, a expressão de moléculas de adesão induz a formação de agregados de plaquetas e células tumorais circulantes, fornecendo proteção contra as condições reológicas e promovendo sua sobrevivência contra a eliminação imunológica. A interação plaqueta-célula tumoral estimula vias associadas a transição epitélio mesenquimal, ademais, auxilia a adesão de células tumorais ao endotélio, permitindo a parada e extravasamento de células cancerígenas. Prever interações entre células tumorais e plaquetas pode auxiliar no monitoramento da doença e de seus riscos trombóticos associados e estabelecer mecanismo de falha nessa comunicação pode tornar a célula tumoral incompetente para completar a cascata metastática, auxiliando no tratamento.

Palavras-chave: Plaquetas; neoplasias; metástase; agregação plaquetária induzida por células tumorais; ativação plaquetária.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in most countries, and with the aging population its incidence is expected to increase further. It is a heterogeneous disease in which individual factors, including genetic predisposition, as well as environmental factors contribute to its development. In recent decades, there have been advances in the prevention and detection of the disease, and although new therapies have improved treatment options for localized cancer, which can often be cured with local surgery or radiation, metastasis, a systemic disease, has been the main reason for therapeutic failure. Metastasis is a highly coordinated and dynamic multistep process, in which the interaction of tumor cells with cells in the host microenvironment is critical to the successful establishment of the metastatic niche. In this scenario, although platelets play an essential role in hemostatic processes, evidence suggests there is a close cross-communication between tumor cells and platelets that assists tumor cells in completing various steps of the metastatic cascade. Hemostatic alterations in patients with solid tumors are frequently observed in the clinical area. The interaction between tumor cells and platelets can occur directly through membrane-bound molecules or the release of soluble mediators, or indirect through the generation of a pro-thrombotic niche, generally by inducing platelet activation. This aberrant platelet activation confers advantages for metastatic progression by different mechanisms. Platelet secretion triggers the release of pro-angiogenic molecules that assist in tumor growth and transmigration of tumor cells. During the metastatic process, the expression of adhesion molecules induces the formation of aggregates of platelets and circulating tumor cells, providing protection against rheological conditions and promoting their survival against immune elimination. Platelet-tumor cell interaction stimulates pathways associated with epithelial-mesenchymal transition, furthermore, it aids adhesion of tumor cells to the endothelium, allowing arrest and extravasation of cancer cells. Predicting interactions between tumor cells and platelets may help in monitoring the disease and its associated thrombotic risks, and establishing the mechanism of failure in this communication may render the tumor cell incompetent to complete the metastatic cascade, aiding in treatment.

Keywords: Platelets; neoplasms; metastasis; tumor cell-induced platelet aggregation; platelet activation.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de plaquetas em repouso.	16
Figura 2. Esquema da megacariopoese.....	17
Figura 3. Fatores hemostáticos e cascata da coagulação.....	20
Figura 4. Diagrama dos componentes intraplaquetários.	25
Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura comparando as conformações ativa e em repouso da plaqueta.....	28
Figura 6. Receptores relacionados a ativação plaquetária.....	30
Figura 7. Papel da plaqueta na hemostasia e trombose	31
Figura 8. Resumo das funções plaquetárias relacionadas à imunidade	34
Figura 9. Ação antimicrobiana das trombocidinas	35
Figura 10. Ativação de neutrófilos mediada por plaquetas com consequente liberação de NETs	36
Figura 11. Transição epitélio-mesenquimal.....	42
Figura 12. Transição epitelial-mesenquimal (EMT): através da disseminação de uma única célula ou através da migração coletiva.....	44
Figura 13. Histórico da associação entre plaquetas e células tumorais	49
Figura 14. Citocinas derivadas de tumor e trombocitose.....	50
Figura 15. Esquema dos mecanismos tumorais de ativação plaquetária direta e indiretamente	52
Figura 16. Principal mecanismo de geração de plaquetas educadas por tumor.	57
Figura 17. Interação de plaquetas com células tumorais no nicho primário acarreta liberação de moléculas bioativas que auxiliam na EMT	59
Figura 18. Esquema dos efeitos mediados pelas plaquetas durante trânsito das células tumorais	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Conteúdo dos grânulos alfa e funções associadas	22
Quadro 2. Conteúdo dos grânulos densos.....	23
Quadro 3. Conteúdo dos lisossomos.....	24
Quadro 4. Principais fatores pró-angiogênicos e fatores anti-angiogênicos mais conhecidos.....	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

12 - HETE	- ácido hidroxeicosatetraenoico
5-HT	- serotonina
ADAMTS-13	- protease de clivagem do Fator de Von Willebrand
ADP	- adenosina difosfato
ATP	- adenosina trifosfato
Ca ²⁺	- cálcio
CCL2	- ligante de quimiocina 2
CCL5	- RANTES
CD	- <i>cluster</i> de diferenciação
CD40L	- ligante de CD40
CE	- células endoteliais
CLEC-2	- receptor do tipo lectina-C 2
CTCS	- células tumorais circulantes
CXCL	- ligante de quimiocina
DAG	- diacilglicerol
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DRM	- doença residual mínima
DTCs	- células tumorais disseminadas dormentes
EGF	- fator de crescimento epidérmico
EMT	- transição epitélio-mesenquimal
EP	- embolia pulmonar
EROs	- espécies reativas de oxigênio
EVs	- vesículas extracelulares
FcR	- receptores Fc
FGF	- fator de crescimento de fibroblastos
fL	- fentolitro
FT	- fator tecidual
FVIIa	fator VII ativado
GDP	- difosfato de guanosina
Glut-3	- transportador de glicose tipo 3
GPCR	- receptor acoplado a proteína G
GPIIb/IIIa	- glicoproteína IIb/IIIa

GPs	- glicoproteínas
GPVI	- glicoproteína VI
GTP	- guanosina trifosfato
HGF	- fator de crescimento de hepatócitos
HGMB1	- proteína de caixa de alta mobilidade
HIF	- fator induzível por hipóxia
ICAM1	- molécula de adesão intercelular 1
IGF	- fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	- interleucina 1
IL-12	- interleucina 12
IL-6	- interleucina 6
INCA	- instituto nacional de câncer
IP3	- inositol-1,4,5-trifosfato
ITAM	- motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina
L	- litro
LPS	- Lipopolissacarídeo
MEC	- matriz extracelular
MET	- transição mesenquimal-epitelial
MHC I	- complexo principal de histocompatibilidade de classe
mi-RNA	- microRNA
MMP	- metaloproteases
mRNA	- RNA mensageiro
MV	- microvesícula
NETs	- armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	- fator nuclear κB
NK	- assassinas naturais
PAI-1	- inibidor do ativador do plasminogênio
PAR	- receptores ativados por protease
PDGF	- fator de crescimento derivado de plaquetas
PDPN	- podoplanina
PIP2	- fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PLC	- fosfolipase c
PLCβ	- fosfolipase c beta

PLC γ 2	- fosfolipase c gamma 2
PMN	- nichos pré-metastáticos
PMP	- microvesículas derivadas de plaquetas
PS	- fosfatidilserina
PSGL-1	- glicoproteína ligante de selectina-P
RNA	- ácido ribonucleico
RRPs	- receptores de reconhecimento de padrões
sCD40L	- forma solúvel do ligante de CD40
TCIPA	- agregação plaquetária induzida por células tumorais
TEM	- migração transendotelial
TEV	- tromboembolismo venoso
TFPI	- inibidor da via do fator tecidual
TGF- β	- fator de crescimento transformador β
TLR	- receptores do tipo <i>toll</i>
TNF- α	- fator de necrose tumoral α
TPO	- trombopoietina
TSP-1	- trombospondina-1
TVP	- trombose venosa profunda
TxA2	- tromboxano A2
VCAM1	- molécula de adesão vascular 1
VEGF	- fator de crescimento endotelial vascular
VWF	- fator de Von Willebrand
X	- Fator X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
3 MÉTODOS	15
4 DESENVOLVIMENTO	16
4.1 FISILOGIA DAS PLAQUETAS	16
4.1.1 Estrutura plaquetária:	18
4.1.1.1 Glicocálice	18
4.1.1.2 Membrana plasmática	18
4.1.1.3 Grânulos plaquetários	20
4.1.1.4 Organelas	23
4.1.1.4.1 <i>Lisossomos</i>	23
4.1.1.4.2 <i>Sistema de membranas internas</i>	24
4.1.1.5 Principais glicoproteínas de superfície	25
4.1.1.5.1 <i>Complexo GPIb-IX-V</i>	25
4.1.1.5.2 <i>Glicoproteína VI</i>	26
4.1.1.5.3 <i>Glicoproteína IIb/IIIa</i>	26
4.1.2 Papel na hemostasia e trombose	26
4.1.2.1 Adesão plaquetária	26
4.1.2.2 Ativação plaquetária	27
4.1.2.3 Agregação plaquetária	31
4.1.2.4 Secreção plaquetária	31
4.1.3 Funções não hemostáticas relacionadas a inflamação e defesa do hospedeiro	32
4.2 NEOPLASIAS	37
4.2.1 Metástase	38
4.2.1.1 Angiogênese	39
4.2.1.2 Destacamento de células tumorais	41
4.2.1.3 Intravasamento	44
4.2.1.4 Interações em trânsito	45
4.2.1.5 Extravasamento	46
4.2.1.6 Colonização metastática	46
4.2.1.7 Dormência	47
5 EFEITOS MEDIADOS POR PLAQUETAS NA METÁSTASE	48
5.1 HISTÓRICO	48
5.2 TROMBOSE	49
5.3 MECANISMOS TUMORAIS DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA	51
5.3.1 Fatores hemostáticos	52
5.3.2 Proteínas de adesão plaquetária	53
5.3.3 Interação com células de estroma	54
5.3.4 Interações via vesículas extracelulares	55
5.4 PLAQUETAS EDUCADAS POR CÉLULAS TUMORAIS	56
5.5 ANGIOGÊNESE E MIGRAÇÃO TRANSENDOTELIAL (TEM)	57
5.6 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL	59
5.7 HETEROAGREGADOS E EVASÃO IMUNE	60

5.8 ADESÃO E EXTRAVASAMENTO.....	62
5.9 FORMAÇÃO DE NICHOS SECUNDÁRIOS	63
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e está entre as principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos) na maioria dos países. Prevê-se que mais de 20 milhões de novos casos de câncer apareçam mundialmente antes de 2025 (LEWANDOWSKA et al, 2019).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a estimativa para o Brasil a cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorram 625 mil casos novos de câncer. A morbidade e a mortalidade causadas pelo câncer vêm aumentando, em parte pelo crescimento e envelhecimento populacional e pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer (INCA, 2020).

A metástase, processo de disseminação de células tumorais por via circulatória (sanguínea ou linfática), para produzir um novo crescimento em órgãos ou regiões distantes do tumor primário (TERUEL, 2005) é a principal causa de falha na terapia do câncer (FARES et al., 2020).

Apesar de as plaquetas serem contribuintes centrais para a hemostasia, tráfego de leucócitos durante a inflamação e manutenção da estabilidade do vaso, há evidências significativas para apoiar seu papel essencial no suporte à metástase por diferentes mecanismos (ROVATI, 2022). Desde a segunda metade do século XIX, vários mecanismos dependentes de plaquetas favorecendo a disseminação metastática têm sido identificados, destacando o papel das plaquetas como atores ativos no crescimento e disseminação do câncer (SMEDA, 2020).

A interação entre plaquetas e células tumorais é evidentemente recíproca. As plaquetas têm um efeito estimulador sobre a progressão do câncer, enquanto, ao mesmo tempo, a presença de uma doença maligna afeta múltiplas características e funções plaquetárias. Por exemplo, tumores malignos demonstraram aumentar o número de plaquetas e sequestrar as funções das plaquetas para promover a progressão do câncer (SABRKHANY et al., 2021).

No cenário clínico, a trombocitose e a hiperativação plaquetária estão associadas à progressão do câncer e um pior prognóstico (LUCOTTI, 2020). A trombocitose é frequentemente observada em pacientes com tumores malignos metastáticos e deve-se à produção de citocinas pelas células tumorais resultando no aumento da trombopoiese (LOU, 2015).

As células tumorais ativam as plaquetas por mecanismos distintos (SCHLESINGER, 2018), contribuindo para liberação de vários fatores pró-tumorigênicos. Por exemplo, o fator de crescimento transformador β (TGF- β) que demonstrou regular negativamente a reatividade antitumoral das células *natural killer* (NK), enquanto simultaneamente promove a malignidade do câncer ativando a transição epitelial-mesenquimal (EMT) de células cancerosas (SMEDA, 2020).

Outros fatores liberados são fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que induzem a formação de vasos sanguíneos infiltrantes em tumores e pode promover proliferação/diferenciação de células associadas ao câncer no microambiente tumoral (RUBY XU, YOUSEF, HEYU NI, 2018)

A formação de heteroagregados de células tumorais com plaquetas e fibrinogênio atua como um escudo ao redor das células tumorais fornecendo proteção mecânica contra o estresse de cisalhamento. Paralelamente, inibem a atividade protetora das células imunes, que não conseguem reconhecer as células tumorais, e mesmo que as reconheçam, elas não têm acesso para destruí-las (ANVARI, 2022; ROVATI, 2022).

Esse revestimento permite que plaquetas ativadas possam transferir por contato direto o complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) para as células tumorais (LOU, 2015). Este mecanismo permite que as células tumorais exerçam regulação negativa sobre receptores MHC I para escapar da vigilância imunológica das células T (SCHLESINGER, 2018).

Portanto, plaquetas modificam sua função em resposta a estímulos do parênquima tumoral (ROWETH, 2021) e seus mediadores passam a regular as atividades das células cancerígenas (NAILIN, 2015).

A relevância dos estudos acerca de como as plaquetas atuam na metástase as tornam alvos prováveis na busca por terapias mais eficazes contra a metástase, visto que há indícios de que a inibição da função plaquetária tem um efeito inibitório no crescimento do tumor e que isso aumenta a sobrevida global de pacientes. Além disso, até agora as plaquetas têm sido negligenciadas na pesquisa de biomarcadores sanguíneos, apesar da crescente evidência de que plaquetas são importantes no desenvolvimento e progressão de câncer (SABRKHANY et al., 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL:

Abordar os mecanismos pelos quais as plaquetas contribuem para a metástase por via hematogênica.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

Descrever os principais mecanismos diretos e indiretos de ativação plaquetária no câncer.

Abordar a importância dos mediadores químicos liberados com a secreção plaquetária no contexto do câncer.

Discutir os mecanismos de evasão da resposta imunológica pelas células tumorais mediados pelas plaquetas.

Mostrar a interação bidirecional plaqueta-célula tumoral na progressão metastática do câncer e suas consequências.

possíveis alvos para terapias antiplaquetárias para prevenção da metástase a serem explorados por estudos posteriores.

3 MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa nos idiomas inglês, português e espanhol com base em artigos científicos publicados na base de dados PubMed no período de 2015 a 2022, porém, referências de conteúdo básico em livros compreendendo conceitos fundamentais publicados em períodos anteriores também foram consideradas.

Os artigos científicos filtrados a partir dos descritores e datas estabelecidas foram pré-selecionados, primeiro com base no título e em uma segunda análise com base no resumo.

Posteriormente, a análise do material selecionado foi realizada a partir da leitura de toda extensão dos trabalhos científicos, sendo citados e referenciados ao longo do nosso trabalho os pontos pertinentes ao tema-estudo.

Os critérios de inclusão foram definidos conforme a pertinência e relevância ao tema, já os critérios de exclusão foram de artigos que não se referiam ao assunto ou apresentavam informações ambíguas.

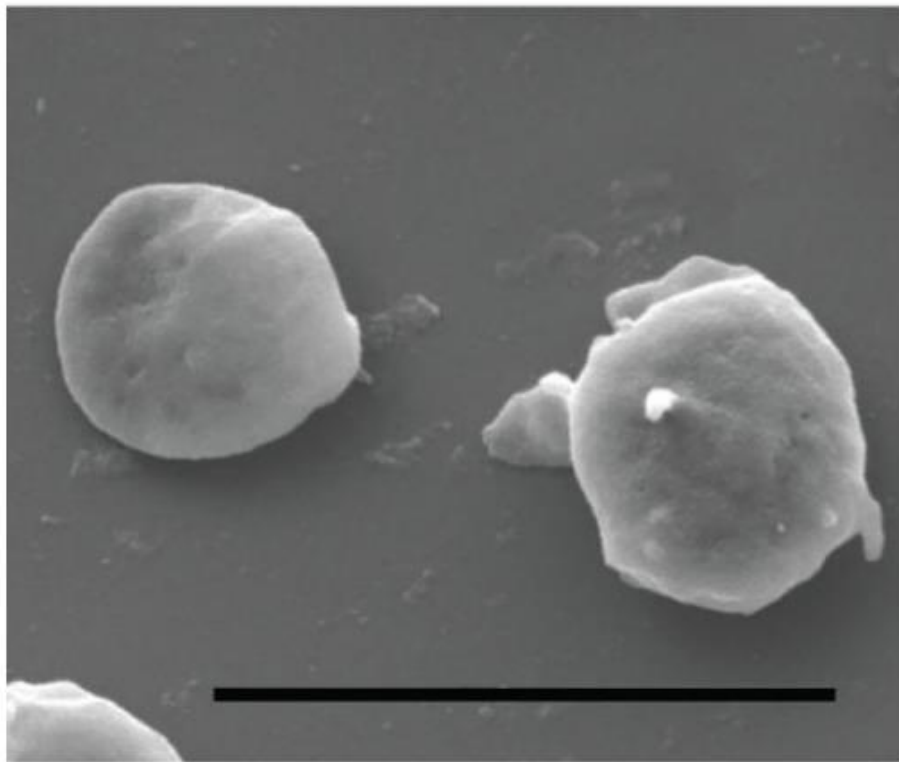
Na busca pelos artigos empregamos os seguintes descritores: plaquetas, estrutura plaquetária, metástase, câncer, trombocitose no câncer, plaquetas e metástase, plaquetas e câncer, fisiologia das plaquetas, interação plaquetas e células tumorais, neoplasia, angiogênese tumoral, transição epitélio-mesenquimal.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 FISIOLOGIA DAS PLAQUETAS

Plaquetas são células anucleadas metabolicamente ativas com formato discoidal, conforme Figura 1, contendo numerosas organelas funcionais, uma ampla gama de receptores de superfície, moléculas de adesão, numerosos grânulos, proteínas pré-embaladas e várias formas de RNA (ácido ribonucleico) de suas células precursoras (KOUPENOVA *et al.*, 2018; LUCOTTI *et al.*, 2020; YUN *et al.*, 2016). As plaquetas não contêm um núcleo, portanto, os transcritos de RNA mensageiro (mRNA) existentes se originam de megacariócitos durante a síntese de plaquetas (SABRKHANY *et al.*, 2021). Uma vez que possuem mRNA, as plaquetas podem sintetizar quantidade considerável de proteínas (YUN *et al.*, 2016).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de plaquetas em repouso.

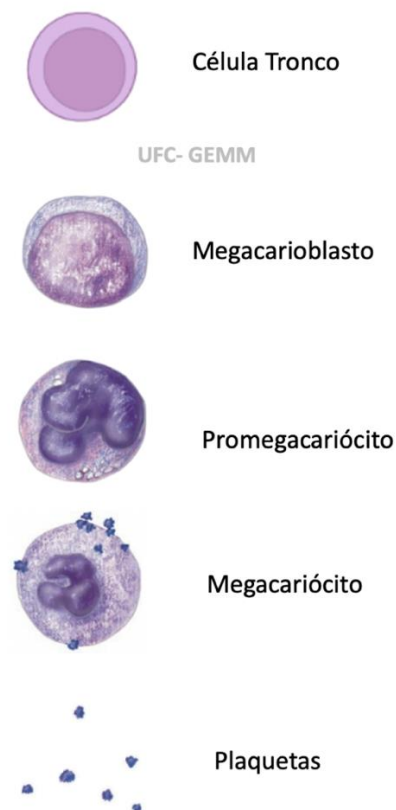


Fonte: KOUPENOVA *et al.*, 2018

As plaquetas derivam da linhagem hematopoiética a partir de megacariócitos, sendo sua produção um processo sistemático e regulado por várias citocinas e fatores de crescimento, embora a trombopoietina (TPO) seja o regulador chave (HOLINSTAT *et al.*, 2017; YUN *et al.*, 2016). A megacariopoese, que tem seus principais tipos

celulares representados na Figura 2, é iniciada com a célula-tronco hematopoiética que a partir de estímulos se diferencia no megacarioblasto, este possui capacidade de divisão e continua aumentando de volume até gerar o pró-megacariócito, que apresenta seu potencial de divisão restringido ao núcleo. Origina-se o megacariócito, cujo núcleo é poliploide, o citoplasma cresce e libera milhares de plaquetas (AZEVEDO, 2019). Megacariócitos maduros reestruturam seu citoplasma e estendem projeções pseudopodais referidas como proplaquetas através das células endoteliais sinusoidais e liberam plaquetas para a circulação (YUN *et al.*, 2016). A megacariopoese ocorre na medula óssea ou, como foi demonstrado mais recentemente, no pulmão (HOLINSTAT *et al.*, 2017).

Figura 2. Esquema da megacariopoese.



Fonte: Adaptado de YOUNG; POULSEN, 2003.

Uma vez liberadas por seu precursor megacariocítico, as plaquetas entram na corrente sanguínea e circulam por 7 a 10 dias (KOPENOUVA *et al* 2019). Evidências acumuladas sugerem que a população de plaquetas em um indivíduo é heterogênea,

o que provavelmente resulta de diferenças durante a trombopoiese (por exemplo, pela formação de proplaquetas de megacariócitos dissimilares), condições ambientais e envelhecimento das plaquetas (ESTEVEZ *et al.*, 2017).

Depois dos eritrócitos, as plaquetas são as células prevalentes na corrente sanguínea, sendo encontradas 150 a 400 x 10⁹ /L em indivíduos saudáveis e o volume médio de plaquetas varia entre 7,5 e 10,5 fL (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016; KOPENOUVA, 2019; GLADER, 2018).

A vida útil da plaqueta é limitada devido ao fato dela não possuir núcleo e estar exposta a altas forças de cisalhamento no vaso. No final de sua vida no vaso ou após a ativação completa da plaqueta e incorporação em um coágulo em formação no vaso, elas são removidas do vaso por neutrófilos e macrófagos e transportadas para o baço para remoção do corpo (HOLINSTAT *et al.*, 2017). No estado estacionário, quando a produção de plaquetas é igual à destruição, o *turn over* plaquetário é estimado em 1,2 a 1,5 x 10¹¹ células/dia (GLADER, 2018)

4.1.1 Estrutura plaquetária:

4.1.1.1 Glicocálice

O glicocálice como revestimento externo da plaqueta é uma estrutura dinâmica e o local do primeiro contato com o meio envolvente. Ele contém glicoproteínas (GPs) de superfície necessárias para a interação de plaquetas com estruturas subendoteliais da parede do vaso lesado, ativação plaquetária, adesão e agregação plaquetária, bem como retração do coágulo (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

A carga negativa líquida do glicocálice fornece uma força repulsiva que impede a agregação espontânea de plaquetas à medida que elas interagem com outras plaquetas, células sanguíneas e endoteliais durante o fluxo (MICHELSON, 2019). Além disso, essa carga negativa permite a captura de componentes plasmáticos na superfície da plaqueta, facilitando a endocitose (MICHELSON, 2019).

4.1.1.2 Membrana plasmática

A bicamada lipídica é morfológicamente semelhante às membranas de outros tipos de células, mas desempenha um papel importante na coagulação do sangue (MICHELSON, 2016).

Os fosfolipídios neutros fosfatidilcolina e esfingomielina predominam na camada plasmática, já os fosfolipídios aniônicos ou polares fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina predominam na camada citoplasmática interna, além disso, contém fator tecidual (FT). Esses fosfolipídios aniônicos, especialmente o fosfatidilinositol, auxiliam na ativação plaquetária fornecendo ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado que se converte nos eicosanoides, prostaglandina e tromboxano A₂, durante a ativação plaquetária (FRITSMA, 2015; MICHELSON, 2016).

Uma característica específica da membrana plasmática plaquetária é sua capacidade de suportar a geração de trombina através da cascata de coagulação, fornecendo uma superfície pró-coagulante para a montagem de complexos enzimáticos da cascata de coagulação (MICHELSON, 2019).

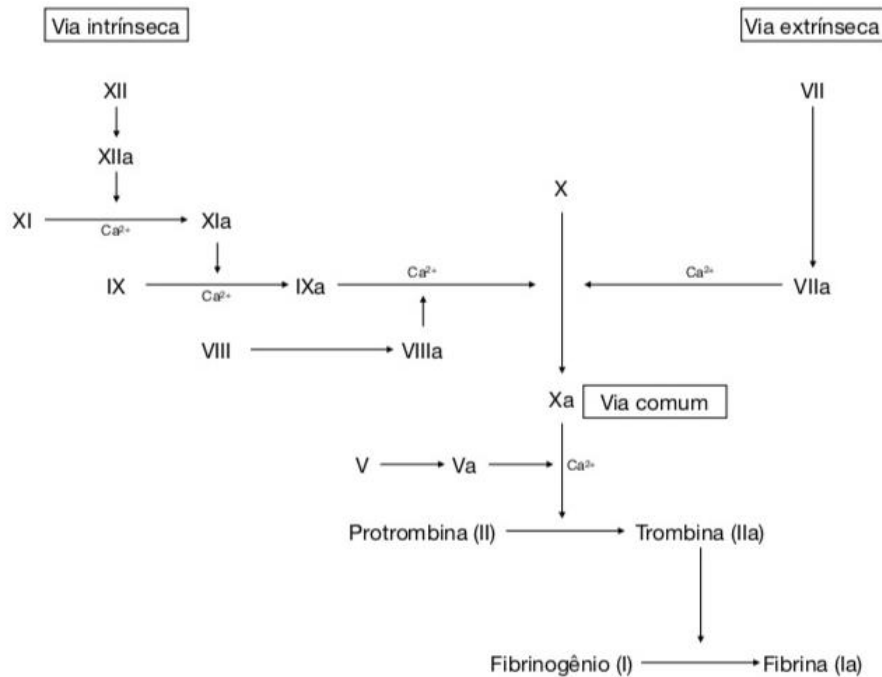
A coagulação ocorre por meio da interação de enzimas, cofatores e inibidores para gerar uma resposta hemostática, resultando na formação de trombina que, então, quebra a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina. A cascata clássica divide a coagulação em uma via extrínseca (envolvendo elementos do sangue e elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) e via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular), que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X (X) (FERREIRA *et al.*, 2010).

Na via extrínseca, o fator VII plasmático é ativado na presença do fator tecidual (FT), formando o complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT), responsável pela ativação do fator X (FERREIRA *et al.*, 2010).

Na via intrínseca, o fator XII é ativado quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas, processo denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular. O fator XII ativado ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado por baixos níveis em de trombina, e em presença de íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X da coagulação, que desencadeia a ativação da protrombina em trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (FERREIRA *et al.*, 2010).

Para melhor entendimento do papel dos fatores hemostáticos citados, a Figura 3 mostra um esquema das etapas da cascata da coagulação.

Figura 3. Fatores hemostáticos e cascata da coagulação.



Fonte: Medway. São Paulo, 2019. Disponível em: www.medway.com.br/. Acesso em: 09 abr. 2023. O desenvolvimento deste trabalho está baseado no modelo clássico da cascata da coagulação apenas por este ser o mais utilizado na maioria dos artigos, provavelmente por questões didáticas e dada sua facilidade na interpretação dos exames laboratoriais. No entanto, não podemos nos abster de mencionar a importância do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares, o qual propõe a ativação do processo de coagulação sobre diferentes superfícies celulares em quatro fases que se sobrepõem iniciação, amplificação, propagação e finalização, e que melhor representa a coagulação *in vivo*.

A maioria das proteínas ligadas à membrana já estão presentes na superfície das plaquetas em repouso, por exemplo, GPIIb/IIIa, receptores da família de imunoglobulinas, como GPVI, receptores Fc (FcR), molécula de adesão da plaqueta à célula endotelial, o complexo GPIb-IX-V, tetraspaninas, CD36 e Glut-3. No entanto, algumas proteínas, incluindo fibrocistina L, CD109 e P-selectina são expressas na superfície das plaquetas ativadas, mas não em plaquetas em repouso. A P-selectina também é expressa em células endoteliais e está envolvida na adesão de células tumorais (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016; SCHLESINGER, 2018).

4.1.1.3 Grânulos plaquetários

Muitas funções das plaquetas resultam da vasta gama de mediadores pré-formados de membrana celular e mediadores solúveis contidos nos grânulos, sendo

que os três principais tipos de grânulos secretores são os grânulos alfa (α), grânulos densos (δ) e lisossomos (GLADER, 2018; YUN *et al.*, 2016).

Os grânulos α , geralmente presentes entre 40 e 80 por plaqueta, são distribuídos por toda a célula e são os grânulos plaquetários predominantes (GLADER, 2018; MICHELSON, 2019). São os locais de armazenamento de proteínas plasmáticas endocitadas por plaquetas e megacariócitos (GLADER, 2018).

Enquanto a zona submembranosa dos grânulos α contém fator de von Willebrand (VWF), sintetizado nos megacariócitos, em estruturas semelhantes a tubos, várias proteínas são encontradas em sua zona periférica, incluindo proteínas sintetizadas por megacariócitos, como fator da coagulação V, trombospondina, P-selectina e VWF, bem como proteínas sintetizadas externamente captadas pelas plaquetas (por exemplo, fibrinogênio). Ao liberar fatores de coagulação, como fatores V e IX, os grânulos α também participam da hemostasia secundária. Além disso, estão envolvidos na manutenção do equilíbrio hemostático secretando proteínas que limitam a coagulação, incluindo antitrombina, proteína S e inibidor da via do FT (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

As proteínas β -tromboglobulina, fator plaquetário 4 (PF4) e trombospondina são sintetizadas ainda nos megacariócitos e altamente concentradas nos grânulos α das plaquetas (GLADER, 2018). A trombospondina pode compreender até 20% da proteína plaquetária total liberada em resposta à trombina e provavelmente participa de vários processos biológicos (GLADER, 2018).

Os grânulos α também contêm muitos fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β e VEGF. Essas moléculas sinalizadoras podem contribuir para a atividade mitogênica e angiogênica. Tanto as proteínas pró-angiogênicas quanto anti-angiogênicas, por exemplo, VEGF e endostatina, respectivamente, são armazenadas nos α -grânulos. Como as populações de proteínas reguladoras da angiogênese podem ser seletivamente compartimentadas e liberadas das plaquetas é uma área de investigação ativa (GLADER, 2018).

Os grânulos α das plaquetas servem como um reservatório importante para GP IIb/IIIa (ou integrina α IIb β 3) que contribui significativamente para os receptores de fibrinogênio da superfície das plaquetas ativadas (GLADER, 2018).

A relação das funções associadas aos grânulos α e as moléculas neles contidas responsáveis por tais funções foram sintetizadas e podem ser observadas no Quadro 1 a seguir:

Quadro 1. Conteúdo dos grânulos alfa e funções associadas

Grânulos	Função	Conteúdo
Grânulos α	Proteínas integrais de membrana	α IIb β 3, GPIb-IX-V, GPVI, P-selectin
	Coagulantes, anticoagulantes e proteínas fibrinolíticas	Fatores V, IX, XIII, antitrombina, inibidor da via do fator tecidual, plasminogênio
	Proteínas de adesão	Fibrinogênio, Fator de Von Willebrand, trombospondina
	Quimiocinas	CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL8, CCL2, CCL3, CCL5
	Fatores de crescimento	Fator de crescimento epidérmico, TGF- β
	Pró-angiogênicos	VEGF, PDGF, EGF; TGF- α e - β ; interleucinas (IL-6, IL-8 etc.); quimiocinas; e esfingosinas
	Antiangiogênicos	Trombospondina-1, endostatina, PF4, Inibidores das metaloproteínas, interferons α , β , e γ e estatinas.

Fonte: Adaptado de GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; FRELINGER; MICHELSON; GREMMEL, 2016.

Os grânulos densos, também chamados de corpos densos ou grânulos delta (δ), estão distribuídos em aproximadamente 5 por plaquetas, descritos como de rápida liberação (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015). Os grânulos densos das plaquetas contêm mais de 200 pequenas moléculas como adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), guanosina trifosfato (GTP), guanosina difosfato (GDP), serotonina (5-HT), epinefrina, polifosfatos, pirofosfato, glutamato, histamina, magnésio e cálcio (Ca^{2+}) necessários para a hemostasia (KROUPENOVA *et al.*, 2018; GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015). As principais moléculas que compõem o conteúdo dos grânulos estão reunidas no quadro abaixo.

Quadro 2. Conteúdo dos grânulos densos

Grânulos	Função	Conteúdo
Grânulos densos	Cátions	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺
	Fosfatos	Polifosfato, pirofosfato
	Aminas bioativas	Serotonina, histamina
	Nucleotídeos	ADP, ATP, UTP, GTP

Fonte: Adaptado de GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; FRELINGER; MICHELSON; GREMMEL, 2016.

Esses grânulos contêm um grande reservatório de ADP, que atua como um forte agonista em locais de lesão vascular e amplifica o efeito de outros estímulos (GLADER, 2018). A membrana do grânulo denso contém P-selectina (GLADER, 2018).

4.1.1.4 Organelas

4.1.1.4.1 Lisossomos

Os lisossomos são vesículas pequenas e acidificadas que abrangem uma variedade de enzimas degradantes, contêm hidrolases ácidas com potencial hidrogeniônico (pH) ótimo de 3,5 a 5,5. Os constituintes lisossômicos são liberados de forma mais lenta e incompleta (máximo, 60% do grânulo) do que grânulos α ou componentes dos grânulos densos após estimulação plaquetária, e sua liberação também requer agonistas mais fortes, como trombina ou colágeno (GLADER, 2018).

Durante a ativação, o conteúdo do lisossomo, exemplificado no Quadro 3, pode ser secretado e pode ser necessário para a degradação de proteínas e fatores extracelulares necessários para a função hemostática adequada (MICHELSON, 2019).

Quadro 3. Conteúdo dos lisossomos

Grânulos	Função	Conteúdo
Lisossomos	Enzimas degradadoras de proteínas	Catepsinas, elastase, colagenase, carboxipeptidase
	Enzimas Degradantes de Carboidratos	Glucosidase, galactosidase, manosidase
	Enzimas de clivagem de éster de fosfato	fosfatase ácida

Fonte: Adaptado de GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; FRELINGER; MICHELSON; GREMMEL, 2016.

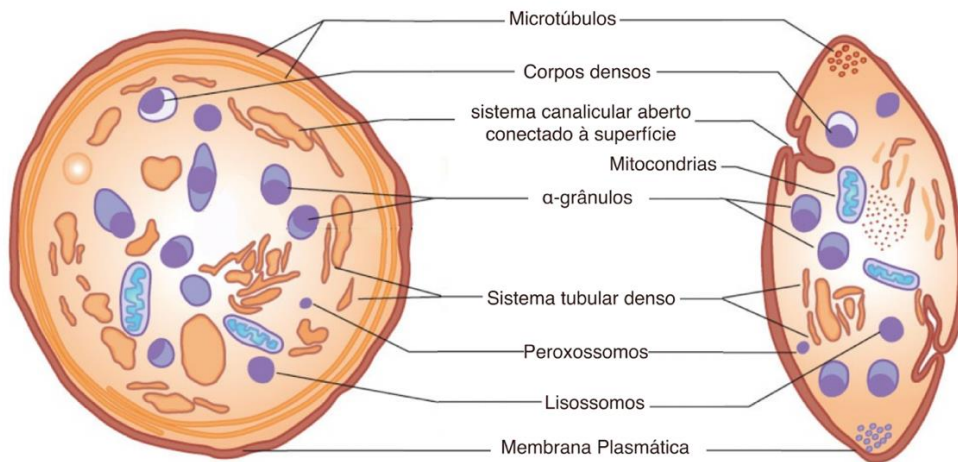
4.1.1.4.2 Sistema de membranas internas

Além da membrana plasmática externa, as plaquetas apresentam vários sistemas de membranas internas como o complexo de Golgi, o sistema canalicular aberto conectado à superfície, o sistema tubular denso e o retículo endoplasmático rugoso (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016), alguns dos quais estão ilustrados na Figura 4 para melhor compreensão das descrições a seguir.

O sistema canalicular aberto é uma parte da membrana de superfície da plaqueta, que se estende para o interior da plaqueta e, ao fazê-lo, forma uma estrutura tubular, cujos canais podem ser usados para o transporte de componentes do plasma para grânulos α e pode servir como rota para a liberação de conteúdo granular durante a ativação plaquetária (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

O sistema tubular denso é um resíduo do retículo endoplasmático liso dos megacariócitos e consiste em canais dispersos aleatoriamente no citoplasma das plaquetas, sendo que este, juntamente com o cálcio extracelular, são as principais fontes de cálcio para a ativação plaquetária (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

Figura 4. Diagrama dos componentes intraplaquetários.



Fonte: Adaptado de GLADER, 2018

4.1.1.5 Principais glicoproteínas de superfície

Embora existam muitos tipos de glicoproteínas na superfície plaquetária, o complexo GPIb-IX-V, GPVI e GPIIb/IIIa (também conhecida integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) são considerados os mais importantes, mediando a adesão, ativação e agregação plaquetária, respectivamente (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

4.1.1.5.1 Complexo GPIb-IX-V

GPIb-IX-V propaga a adesão de plaquetas ativadas a células endoteliais e estruturas subendoteliais da parede lesada do vaso, principalmente pela ligação de seu ligante mais importante, VWF, capaz de se ligar ao colágeno. Outro ligante para GPIb-IX-V é trombospondina, que parece mediar a adesão plaquetária em altas taxas de cisalhamento na ausência do VWF (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

Além de seu papel na adesão plaquetária, o GPIb-IX-V possui atividade procoagulante nas plaquetas ativadas, fornecendo locais de ligação para trombina, fator XI e cininogênio de alto peso molecular (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

4.1.1.5.2 *Glicoproteína VI*

GPVI é o principal receptor de sinalização do colágeno. O GPVI existe como um complexo com cadeia γ de FcR, a qual é expressa em plaquetas em forma monomérica e forma dimérica. A forma monomérica é particularmente presente em plaquetas inativas e sua afinidade pelo colágeno é muito baixa para permitir a ativação em resposta a concentrações fisiológicas de colágeno. Em contraste, o dimérico tem uma afinidade aumentada pelo colágeno, sendo que essa ligação pode resultar em sinais intracelulares que levam à geração de mais dímeros. Sem a cadeia γ do FcR, o GPVI não atinge a superfície plaquetária e a ativação plaquetária induzida por colágeno não é iniciada (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

4.1.1.5.3 *Glicoproteína IIb/IIIa*

A GP IIb/IIIa, também conhecida como integrina α IIb β 3, pertence à família das integrinas de moléculas de adesão celular e é o receptor mais abundante e expresso seletivamente em plaquetas, megacariócitos, mastócitos, basófilos e algumas células tumorais (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016; TAO; YUNGA; WILLIAMS; MCCARTHY, 2021). Além disso, GP IIb/IIIa está presente nas membranas dos grânulos α das plaquetas e é adicionalmente expressa após ativação (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016). É um heterodímero transformado de seu estado de baixa afinidade em repouso para um receptor de alta afinidade como o passo final da ativação plaquetária e, posteriormente, medeia a agregação plaquetária em um nível molecular (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

4.1.2 **Papel na hemostasia e trombose**

4.1.2.1 Adesão plaquetária

A plaqueta flui através do vaso em estreita proximidade com a parede deste, vido à natureza biofísica dos constituintes do sangue e forças de cisalhamento dentro do vaso (HOLINSTAT *et al.*, 2017). Os mecanismos de adesão plaquetária nos locais de lesão dependem na maioria das condições reológicas locais (STEGNER, 2011).

As células endoteliais danificadas liberam VWF de organelas de armazenamento citoplasmático, que adere ao local lesionado e forma uma ponte entre o colágeno exposto e o complexo receptor GP Ib-IX-V da membrana plaquetária. A

reação VWF-GPIb-IX-V é temporária e reversível, permitindo a desaceleração da plaqueta e possibilitando outras interações ligante-receptor, como colágeno e GP Ia-IIa (também chamada integrina $\alpha 2\beta 1$) ou GPVI (FRITSMA, 2015; GLADER, 2018).

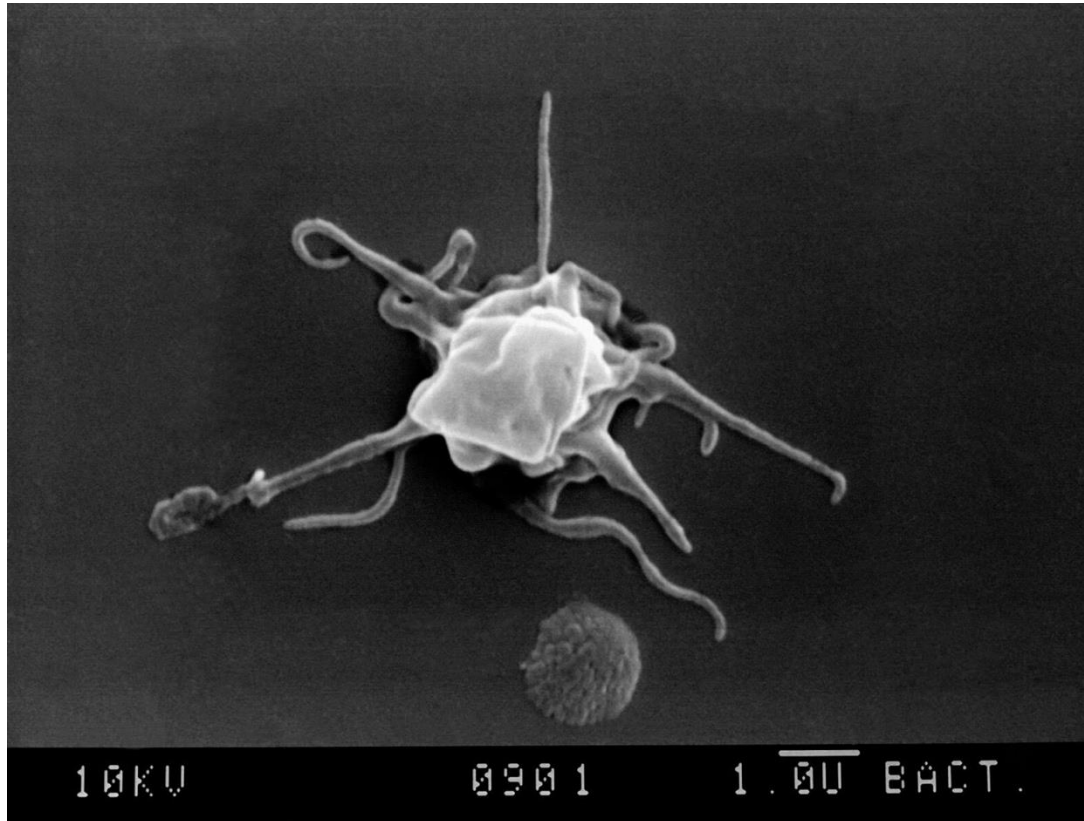
A ligação do GPVI de baixa afinidade ao colágeno e resulta em sinais intracelulares com subsequente ativação de integrinas, incluindo GP Ia-IIa e GP IIb/IIIa, bem como agrupamento adicional de GPVI (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016). O efeito combinado de GP Ib-IX-V, GP VI e GP IIb-IIIa faz com que a plaqueta se ligue firmemente à superfície danificada (FRITSMA, 2015). Após a ativação pelo colágeno e outros agonistas, o GPVI é rapidamente eliminado da superfície das plaquetas (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

As interações plaquetárias entre VWF permanecem localizadas e a enzima plasmática secretada no fígado, ADAMTS-13 (protease de clivagem do fator de von Willebrand), digere o VWF “não utilizado” (FRITSMA, 2015), essa clivagem evita o acúmulo de VWF que, de outra forma, causaria aglomeração espontânea de plaquetas e trombose arterial (GLADER, 2018).

4.1.2.2 Ativação plaquetária

A adesão desencadeia vias internas de ativação plaquetária, bem como uma série de alterações fisiológicas e citoesqueléticas, incluindo uma mudança de uma forma discoide em repouso para um estado ativado com numerosos pseudópodes e liberação do conteúdo dos grânulos (KOUPENOVA *et al.*, 2018) como pode ser observado na foto realizada por microscopia eletrônica apresentada na Figura 5 a seguir.

Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura comparando as conformações ativa e em repouso da plaqueta.



Fonte: *SEM of platelet*. David Gregory & Debbie Marshall. Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Existem duas principais vias de sinalização de ativação das plaquetas: sequência do motivo de ativação baseado em tirosina do imunorreceptor (ITAM) e receptor acoplado à proteína G (GCPR) (YUN *et al.*, 2016).

A ativação plaquetária por GPVI e CLEC-2 (receptor do tipo lectina-C 2), receptores expressos exclusivamente em plaquetas e megacariócitos, é iniciada pela fosforilação da tirosina da sequência do motivo de imunorreceptores (ITAM) dentro de sua cauda citoplasmática (STEGNER, 2011; YUN *et al.*, 2016).

A GPVI é considerada o principal receptor de sinalização envolvido na ativação plaquetária ao colágeno exposto. Após interações de GPVI com o colágeno, as plaquetas iniciam uma forte ativação e liberam o conteúdo dos grânulos α e densos (YUN *et al.*, 2016).

O único ligante fisiológico identificado do CLEC-2 é a podoplanina (STEGNER, 2011), expressa fisiologicamente por fibroblastos, macrófagos, células T auxiliares, células epiteliais, bem como células endoteliais linfáticas, mas também pode estar

presente em células tumorais. A ligação de CLEC-2 da plaqueta à podoplanina mostrou incitar a ativação plaquetária como um requisito para a regulação do desenvolvimento vascular/linfático e manutenção da integridade vascular (TAO *et al.*, 2021).

A maioria dos agonistas solúveis liberados por células ativadas, como ADP, tromboxano A2 (TxA2), e trombina desencadeiam ativação plaquetária por meio de receptores acoplados à proteína G (GPCR). Isso aumenta a concentração citosólica de cálcio e ativa vias de sinalizações específicas. Outros agonistas como epinefrina, prostaglandina E2 e serotonina também podem utilizar GPCR para potencializar as respostas plaquetárias (YUN *et al.*, 2016).

O ADP, liberado das células endoteliais danificadas e das plaquetas ativadas, atua como agonista em dois receptores purinérgicos plaquetários acoplados à proteína G - o P2Y1 acoplado a proteína Gq e o P2Y12 acoplado a Gi. Existe uma complexa interação entre P2Y1 e P2Y12, e a coativação de ambos é necessária para a agregação plaquetária completa (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

A ativação de P2Y1 inicia a agregação plaquetária e é responsável pela alteração da forma plaquetária. No entanto, sem a ativação do P2Y12, o resultado é uma agregação plaquetária pequena e reversível, pois a estimulação de P2Y12 resulta em amplificação e estabilização da resposta de agregação. Devido ao seu papel proeminente na agregação plaquetária, o receptor P2Y12 tornou-se um dos principais alvo da terapia antiplaquetária (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016). Os tratamentos antitrombóticos mais eficazes usados atualmente visam especificamente a cascata de *feedback* positivo ADP/P2Y12, pelo bloqueio de receptores P2Y12 e, assim, limitando a ativação e agregação plaquetária e os riscos de trombose patológica (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015).

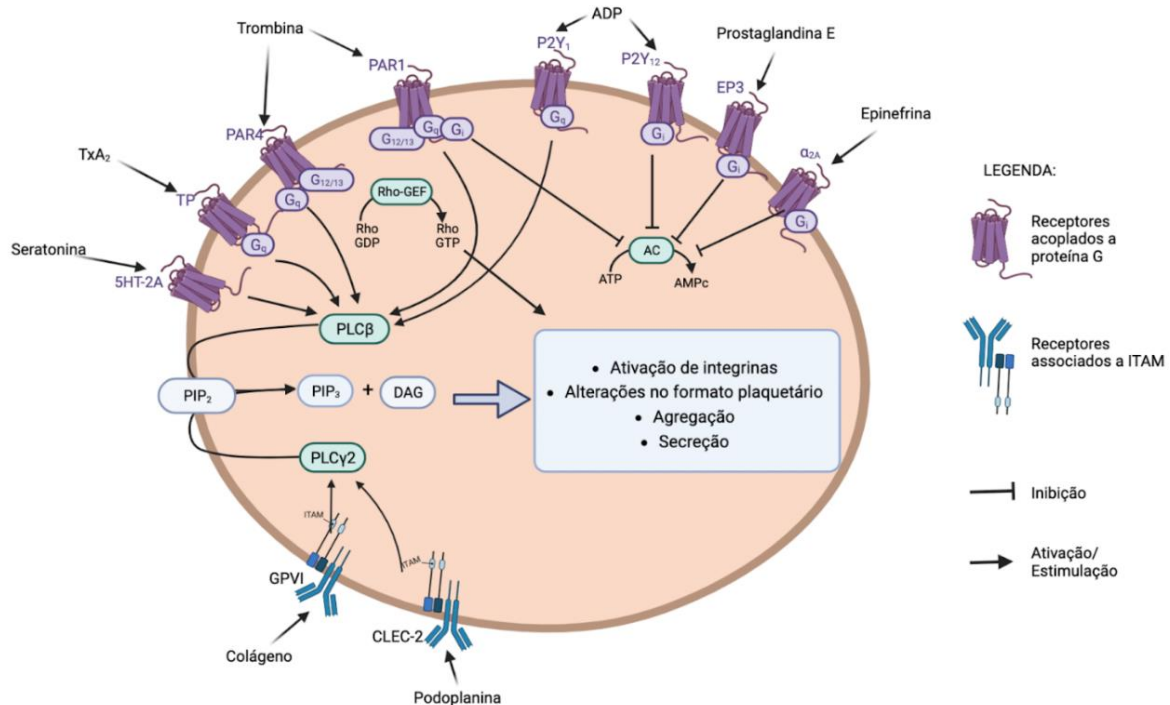
Além da exposição ao colágeno e da secreção de VWF, a lesão dos vasos sanguíneos libera o fator tecidual constitutivo de fibroblastos e células musculares lisas. O fator tecidual desencadeia a produção de trombina através da ligação dos fatores de coagulação Va, VIIa, e Xa à sua fosfatidilserina de superfície, sendo a trombina o agonista plaquetário mais forte e é responsável pela conversão de fibrinogênio em fibrina para estabilizar os tampões de plaquetas (YUN *et al.*, 2016). Além disso, plaquetas ativadas liberam micropartículas contendo fator tecidual (TF)

que também contribuem para a maior geração de trombina (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

A trombina ativa as plaquetas por meio de receptores ativados por protease (PAR) nas superfícies plaquetárias via GPCR (YUN *et al.*, 2016). Existem quatro tipos de PARs. PAR-1 e PAR-4 medeiam a maioria das respostas plaquetárias à trombina, enquanto o PAR-2 não é expresso em plaquetas e o PAR-3 funciona apenas como um cofator para a ativação do PAR-4 pela trombina. Enquanto o PAR-1 é sensível a baixos níveis de trombina, PAR-4 requer maior concentração para ativação plaquetária (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016).

Os receptores P2Y1 e P2Y12, bem como os PARs 1 e 4 e outros receptores expressos na superfície da plaqueta e importantes para a ativação plaquetária estão representados na Figura 6.

Figura 6. Receptores relacionados a ativação plaquetária.



Fonte: Adaptado de STEGNER, 2011. Mecanismos de sinalização: A interação de ligantes aos receptores GPVI ou CLEC-2 ativa a via de sinalização ITAM levando à ativação de fosfolipase Cγ2 (PLCγ2), enquanto a estimulação de GPCR desencadeia a ativação d fosfolipase C tipo β (PLCβ). Ambas as isoformas de PLC hidrolisam fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), que estão relacionados a liberação de Ca²⁺ plaquetário e atividade quinase, respectivamente, induzem a ativação plaquetária por uma rede de vias de sinalização que convergem para a via final comum de ativação plaquetária, a regulação positiva funcional dos

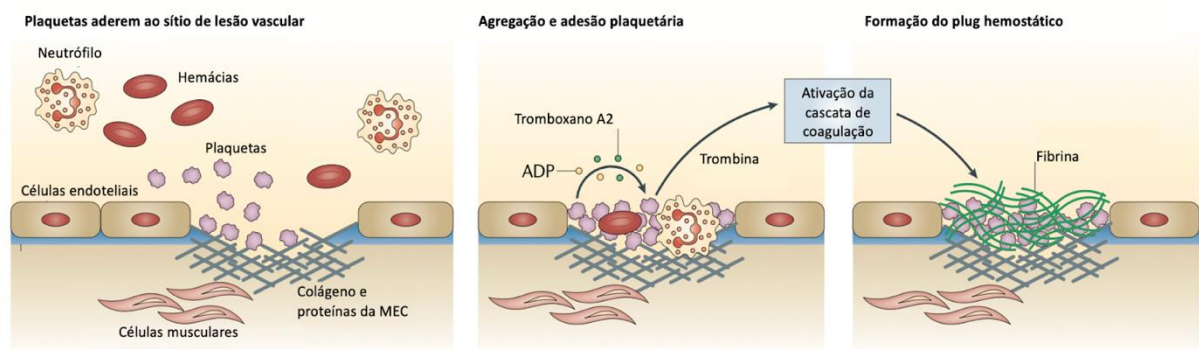
receptores de adesão de integrinas de baixa para o estado de alta afinidade, permitindo a adesão firme e crescimento de trombos (STEGNER, 2011; FRITSMA, 2015).

A ativação plaquetária induzida por agonistas desencadeia eventos de sinalização intracelular que convergem na transformação do domínio extracelular de GP IIb/IIIa (ou $\alpha\text{IIb}\beta_3$) de seu estado de baixa afinidade em repouso em um receptor de alta afinidade, como passo final da ativação plaquetária (GREMMEL; FRELINGER 3rd; MICHELSON, 2016; TAO *et al.*, 2021).

4.1.2.3 Agregação plaquetária

A base molecular para a agregação é a conversão da GPIIb/IIIa de um estado conformacional com baixa afinidade pelo fibrinogênio para um com alta afinidade pelo fibrinogênio. Como o fibrinogênio é uma molécula bipolar, ele pode se ligar simultaneamente a dois complexos de integrina, estabelece ligações cruzadas entre plaquetas adjacentes ativadas causando a agregação e formação de um tampão plaquetário (GIBBINS; MAHAUT-SMITH, 2004), como pode ser observado a Figura 7, que mostra a ordem desses eventos.

Figura 7. Papel da plaqueta na hemostasia e trombose



Fonte: Adaptado de SEMPLE, *et al.*, 2011.

4.1.2.4 Secreção plaquetária

A secreção é o resultado mais abrangente da ativação de plaquetas, e como tal também pode explicar funções de plaquetas além do ambiente imediato do trombo (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015).

Após a ativação plaquetária, os α -grânulos e grânulos densos fundem-se com a membrana plasmática da plaqueta e liberam seu conteúdo para o espaço vascular extracelular. A secreção de proteínas adesivas, como VWF e fibrinogênio de grânulos α e moléculas liberadas de grânulos densos como ADP e serotonina, juntamente com o TxA₂, agem de volta em plaquetas circulantes e contribuem para a sinalização de *feedback* positivo que sustenta a agregação plaquetária (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015).

As plaquetas podem se "comunicar" entre si e com outras células via essa série de substâncias bioativas secretadas de seus grânulos intracelulares (KOUPENOVA et al., 2018).

4.1.3 Funções não hemostáticas relacionadas a inflamação e defesa do hospedeiro

Além das funções relacionadas a hemostasia, as plaquetas podem desempenhar atividades relacionadas à inflamação e à imunidade (KAPUR et al., 2015), as quais estão resumidas de forma esquemática na Figura 8. Apesar de não ser estritamente apontada dentro da via inflamatória, a plaqueta pode ser vista como uma extensão do sistema imune celular (FRANCO; CORKEN; WARE, 2015).

Presume-se que as plaquetas e os leucócitos compartilhem uma célula ancestral comum, facilitando os papéis hemostático e imunológico em vertebrados inferiores, como peixes e pássaros (FRANCO; CORKEN; WARE, 2015). Teoricamente, isso poderia explicar o porquê de as plaquetas terem muitas funções relacionadas à imunidade, ou seja, algumas das funções protetoras dessa célula progenitora ainda persistem nas plaquetas dos mamíferos (SEMPLE et al., 2011).

As plaquetas exibem uma habilidade inata para englobar partículas estranhas. Essa internalização localiza os microrganismos dentro do sistema canalicular aberto; sem dar origem a degradação microbiana ou qualquer forma de fagocitose. Assim, a plaqueta atua como uma célula de armazenamento para diversas moléculas bioativas e enzimas líticas, mantendo uma capacidade de consumir invasores, indicando que a plaqueta pode de fato descender de um granulócito antigo (FRANCO; CORKEN; WARE, 2015).

As plaquetas expressam receptores imunes funcionais chamados receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), que incluem receptores do complemento e

receptores do tipo *Toll* (TLRs) tipicamente descritos em células do sistema imune inato (KAPUR et al., 2015; KROUPENOVA et al., 2018).

As proteínas do sistema complemento têm uma relação recíproca com as plaquetas: as plaquetas ativam o sistema complemento e as proteínas do sistema complemento ativam as plaquetas (FRANCO; CORKEN; WARE, 2015).

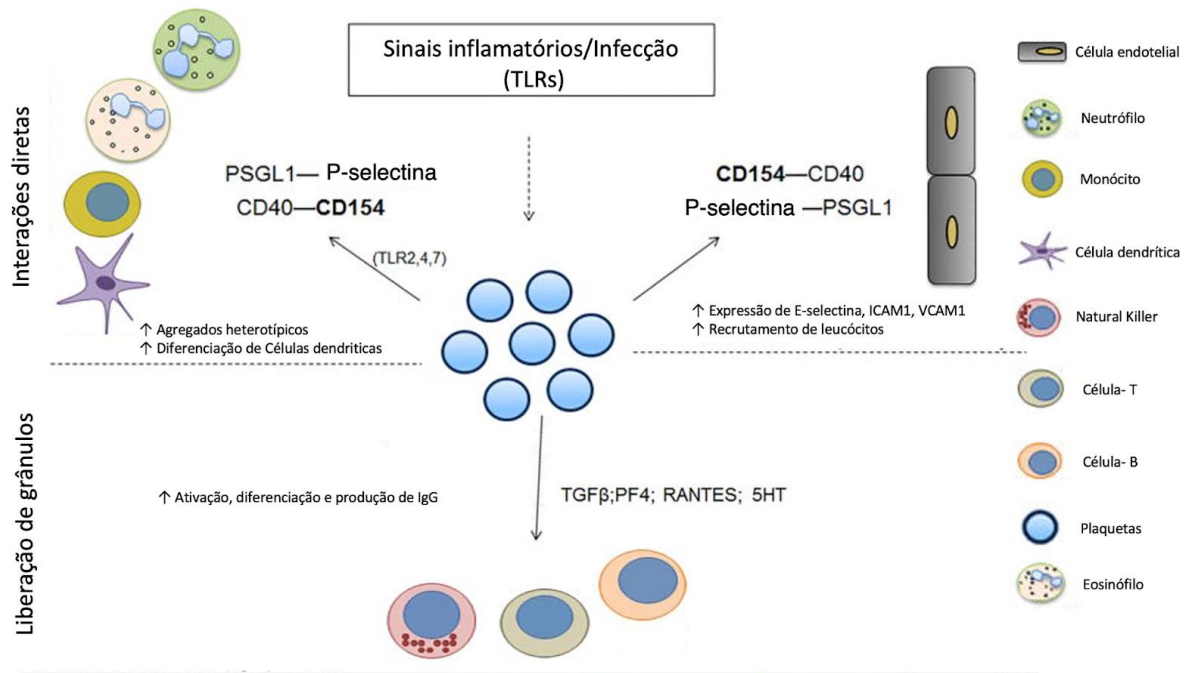
Quando os TLRs de plaquetas detectam espécies microbianas, a ativação plaquetária é iniciada, ocasião em que a célula degranula e libera uma gama de mediadores pró-inflamatórios, que não têm papel aparente na homeostasia, mas induzem várias funções imunes e regulatórias (FRANCO; CORKEN; WARE, 2015; KAPUR et al., 2015; YUN et al., 2016) como a migração de leucócitos através da vasculatura para os tecidos e outras funções pró-inflamatórias como fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (YUN et al., 2016).

Após ser ativada, a plaqueta passa a expressar CD40L, também conhecido como CD154L, bem como também secreta a forma solúvel (sCD40L) desse ligante, sendo que ambos podem interagir com o receptor CD40 em células endoteliais para induzir a regulação ascendente de moléculas de adesão como molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), molécula de adesão vascular 1 (VCAM1), E-selectina e P-selectina, além da liberação de CCL2 (CCL2), interleucina-6 (IL-6) e FT promovendo assim o recrutamento de leucócitos (SEMPLE et al., 2011). Dessa forma, as plaquetas também se associam com leucócitos na circulação e, ao aderir ao endotélio, conseguem prender os glóbulos brancos à parede vascular, ou seja, ao aumentar a capacidade de migração de leucócitos, as plaquetas ajudam na eliminação de uma infecção (FRANCO; CORKEN; WARE, 2015; KROUPENOVA et al., 2018).

Através do eixo CD40L com o receptor CD40, as plaquetas mostraram afetar as células dendríticas, bem como os linfócitos B e T. Portanto, CD40L atua como uma potente molécula secretora que induz ativação de linfócitos, implicando sua relevância para potencializar a resposta imune adaptativa (KROUPENOVA et al., 2018; YUN et al., 2016).

O sCD40L e P-selectina também podem ser reconhecidos pelos leucócitos através dos receptores CD154/CD40 e da glicoproteína ligante-1 de P-selectina (PSGL-1), respectivamente, levando à formação de agregados plaquetas-leucócitos (KROUPENOVA et al., 2018; YUN et al., 2016).

Figura 8. Resumo das funções plaquetárias relacionadas à imunidade

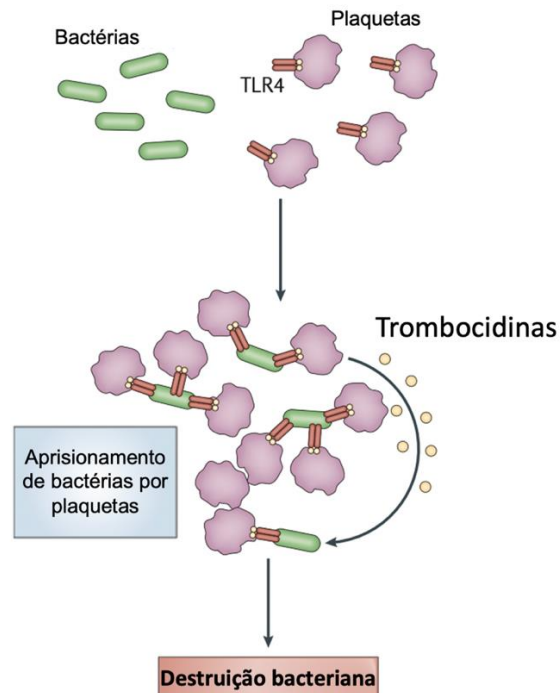


Fonte: Adaptado de KOUPENOVA, 2019.

O fator plaquetário 4 (PF4) é uma das proteínas mais abundantes contidas nos grânulos α das plaquetas com uma ampla gama de atividades relacionadas à imunidade inata. Previne a apoptose de monócitos, promove a diferenciação monocítica em macrófagos e induz a fagocitose e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; YUN *et al.*, 2016). Além disso, a ativação plaquetária libera serotonina e RANTES (CCL5) de grânulos δ que também são conhecidos por mediar a ativação e diferenciação de células T (KOUPENOVA *et al.*, 2018).

As plaquetas ativadas também secretam proteínas antimicrobianas, também conhecidas como trombocidinas, tal como demonstrado na Figura 9, e enzimas líticas em conjunto com os outros grânulos liberados para aumentar a depuração do corpo estranho (SEMPLÉ *et al.*, 2011).

Figura 9. Ação antimicrobiana das trombocidinas



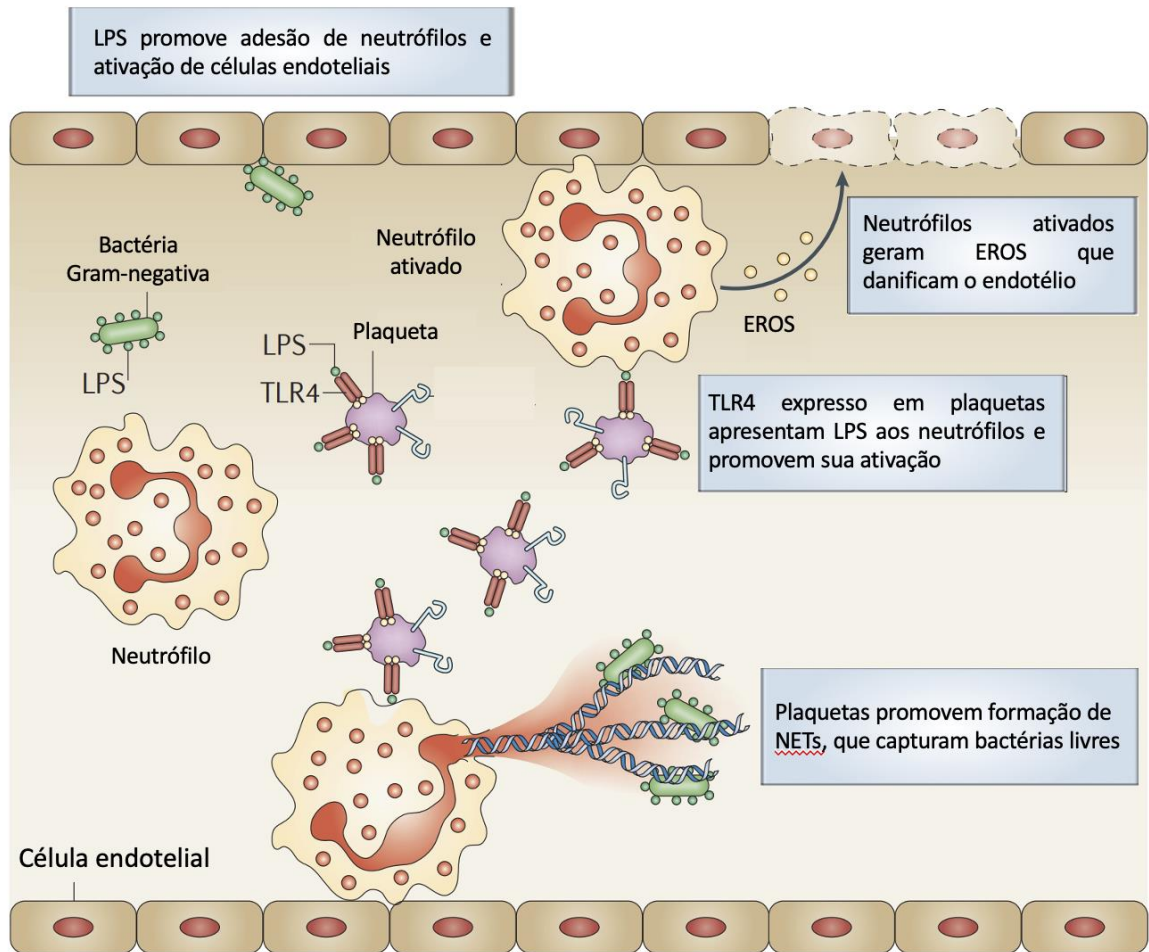
Fonte: Adaptado de SEMPLE et al., 2011

Foi descrita uma nova interação plaqueta-neutrófilo que leva ao "aprisionamento" bacteriano dependente da interação de TLR4 e LPS, que leva a aderência aos neutrófilos e resulta na ativação destes. O LPS ligado às plaquetas estimula a degranulação dos neutrófilos e a liberação de DNA, que forma estruturas semelhantes a armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) que se estendem adiante dos agregados plaquetas-neutrófilos (SEMPLE et al., 2011). Esta interação está representada para melhor entendimento do texto na Figura 10.

As NETs contêm as proteases catepsina G, elastase de neutrófilos e mieloperoxidase, que podem ativar as plaquetas e a cascata de coagulação. Múltiplos ciclos de *feedback* positivo estão presentes em todos os níveis deste sistema (MANDEL et al., 2022).

Embora a formação de NETs possa ter um efeito benéfico para o hospedeiro no isolamento e prevenção da disseminação de bactérias invasoras, a ativação de neutrófilos induzida por plaquetas também pode promover lesões no hospedeiro. Por exemplo, neutrófilos ativados produzem espécies reativas de oxigênio que danificam o endotélio pulmonar (SEMPLE et al., 2011).

Figura 10. Ativação de neutrófilos mediada por plaquetas com consequente liberação de NETs



Fonte: Adaptado de SEMPLE, *et al.*, 2011.

4.2 NEOPLASIAS

O termo neoplasia (do grego *neo* = novo e *plasis* = crescimento, multiplicação celular, ou seja, novo crescimento) é utilizado como sinônimo de tumor e tem sido definido como uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede e não é coordenado com o dos tecidos normais e persiste, de forma excessiva, mesmo após a cessação dos estímulos que provocaram a alteração (FRANCO et al., 2015; TERUEL, 2005).

A carcinogênese é um processo que ocorre no nível celular, etiologicamente envolve mutações em genes que desempenham papel na manutenção do equilíbrio entre a proliferação celular e apoptose e/ou também na regulação de vias metabólicas que garantem a integridade funcional e estrutural das células e tecidos (BRASILEIRO FILHO, 2021; TERUEL, 2005). Em geral, as células apresentam perda ou redução de diferenciação, em consequência dessas alterações (BRASILEIRO FILHO, 2021).

Esse processo é composto por três etapas fundamentais, denominadas iniciação, promoção e progressão. A etapa de iniciação é caracterizada por uma alteração irreversível, não letal, no genoma celular. Usualmente células iniciadas não expressam alterações fenotípicas, mas admite-se que essa lesão genética seja um primeiro passo para o comprometimento da resposta da célula aos mecanismos homeostáticos de controle da proliferação (FRANCO et al., 2015).

Na etapa de promoção, na qual há aumento do número de células iniciadas em um tecido em decorrência de sua expansão clonal, permitindo o repasse das alterações em seu genoma para as gerações futuras (FRANCO et al., 2015). As células iniciadas sob promoção são suscetíveis a novas alterações em seu genoma, as quais propiciam vantagens de crescimento e sobrevivência em relação às células normais, sendo que o conjunto dessas alterações constituem o chamado fenótipo maligno (FRANCO et al., 2015; KUMAR, 2016).

Após a transformação maligna, as células perdem a propriedade de inibição do crescimento por contato e modificam suas vias metabólicas para diminuir a necessidade de fatores de crescimento requeridos para sobrevivência de células normais, apresentando seletividade diminuída a nutrientes requeridos para sobrevivência (FRANCO et al., 2015).

A etapa de progressão da carcinogênese inicia com o estabelecimento das células transformadas, que proliferam e acumulam no tecido, resultando na

manifestação clínica da doença. A partir desta etapa, o controle da doença é cada vez mais desafiador devido ao acúmulo progressivo de alterações genéticas que propiciam instabilidade genômica. Assim, diferentes áreas de um tumor podem apresentar características genotípicas e fenotípicas distintas – fenômeno denominado heterogeneidade tumoral (FRANCO et al., 2015; KUMAR, 2016).

4.2.1 Metástase

Metástase (do grego *metastatis* = mudança de lugar, transferência) é o processo de disseminação, por via circulatória, de células tumorais de um sítio primário para produzir um novo crescimento (tumor secundário) em órgãos ou regiões distantes (TERUEL, 2005) sem continuidade entre os dois focos (BRASILEIRO FILHO, 2021).

A lesão metastática é o resultado de uma ou várias células adquirirem a capacidade de contornar uma série de obstáculos moleculares e biofísicos, que representam obstáculos insuperáveis para suas contrapartes não metastáticas (SUHAIL et al., 2019).

A formação de metástases é um processo complexo que depende de inúmeras interações entre células malignas e componentes dos tecidos normais, especialmente do estroma, e engloba os seguintes fenômenos: destacamento das células da massa tumoral original; deslocamento dessas células através da matriz extracelular (MEC); invasão de vasos linfáticos ou sanguíneos (intravasamento); sobrevivência das células na circulação; adesão ao endotélio vascular no órgão em que as células irão se instalar; saída dos vasos nesse órgão (extravasamento); sobrevivência e proliferação no órgão invadido (colonização); indução de vasos para o suprimento sanguíneo da nova colônia (BRASILEIRO FILHO, 2021; LAMBERT et al., 2017).

Ao longo dos últimos anos, ficou firmemente estabelecido que a dissociação de células cancerosas do sítio primário para locais distantes geralmente ocorre muito cedo e muito antes do diagnóstico do tumor primário (KLEIN et al., 2020).

Classicamente, considerava-se que a metástase era um fenômeno tardio, em que células com potencial de se implantar em outros órgãos surgiriam após várias alterações genéticas e epigenéticas aleatórias que originam clones capazes de formar lesões secundárias. Segundo essa concepção, tais clones são mais agressivos,

infiltram-se nos tecidos e originam metástases que seriam formadas por células geneticamente semelhantes às do tumor primário (BRASILEIRO FILHO, 2021).

Entretanto, mais recentemente, verificou-se que as células cancerosas adquirem as propriedades de se implantar à distância em fase precoce do desenvolvimento de um tumor. De acordo com essa ideia, as células deixam o tumor primitivo muito precocemente, instalam-se em locais distantes e sofrem alterações genéticas e epigenéticas distintas em diferentes sítios secundários, até originar subclones capazes de formar novas lesões tumorais (BRASILEIRO FILHO, 2021).

Uma grande variedade de genes é conhecida por facilitar as etapas da disseminação das células cancerígenas, sendo que alguns desses genes são expressos pelas células cancerosas ainda no tumor primário, iniciando as células para metástase em órgãos específicos, o que corrobora parcialmente com a teoria clássica da metástase. Posteriormente, a expressão de outros genes promotores de metástases se manifesta à medida que as células cancerígenas disseminadas se adaptam a um ambiente específico do tecido hospedeiro, o que por sua vez entra em consenso com a teoria mais recente (GANESH; MASSAGUÉ, 2021).

4.2.1.1 Angiogênese

A angiogênese é um processo biológico complexo, no qual novos vasos sanguíneos capilares crescem a partir da vasculatura pré-existente (FRANCO et al., 2015). Em condições normais, a angiogênese ocorre, por exemplo, durante o desenvolvimento embrionário, ciclo reprodutivo feminino e reparação de feridas. Quando ocorre de forma fisiológica é um processo bem-organizado que envolve diversas etapas e múltiplos indutores e inibidores (GLADER, 2018). O balanço entre estimulação e inibição angiogênica é feito por ampla série de moléculas mediadoras que atuam de forma isolada ou sinergicamente (FRANCO et al., 2015).

No entanto, a angiogênese é um mediador chave e um processo importante no desenvolvimento do câncer (LI et al., 2018) ao viabilizar o suprimento necessário para a sobrevivência das células neoplásicas e o crescimento dos tumores, além de ser crítica também para a disseminação do câncer (FRANCO et al., 2015).

Em 1971, Folkman sugeriu a hipótese de que a proliferação de células malignas sem novo aporte vascular é possível até o limite 1 - 2 mm³ para tumores sólidos,

situação em que a difusão simples de nutrientes no microambiente ainda é eficaz (FRANCO et al., 2015; LI et al., 2018).

O processo normal de angiogênese está sob uma homeostase relativamente dinâmica e é rigidamente controlado por reguladores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos, cujos principais representantes estão reunidos na Tabela 2. Esses reguladores são liberados separadamente das células endoteliais, células tumorais, células estromais, sangue e matriz extracelular. Uma vez que esta homeostase é interrompida, o “interruptor angiogênico” (fenótipo angiogênico) se tornará ativo e iniciará a angiogênese (LI et al., 2018).

Quadro 4. Principais fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos.

Fatores pró-angiogênicos	Antiangiogênicos
VEGF; FGF; PDGF; EGF; TGF- α e - β ; interleucinas (IL-6, IL-8 etc.); quimocinas; e esfingosinas,	TSP-1, endostatina, PF4, IL-12, Inibidores das metaloproteínases, interferons α , β , e γ , estatinas, entre outros.

Fonte: Adaptado de FRANCO; CORKEN; WARE, 2015.

Os processos angiogênicos são desencadeados por eventos biológicos, como mutações genéticas, respostas imunes/inflamatórias, estresse metabólico (hipóxia, baixo pH ou hipoglicemia). Esses fatores podem coexistir ou haver mudança de um para outro durante o crescimento e proliferação do tumor (FRANCO; CORKEN; WARE, 2015).

A hipóxia é um dos principais fatores que impulsionam a angiogênese tumoral, devido ao aumento da expressão de VEGF (LI et al., 2018). Uma vez que a regulação positiva de VEGF é induzida por hipóxia, a angiogênese é iniciada com ativação adicional da sinalização do fator induzível por hipóxia (HIF) para fornecer suprimento de oxigênio, estimulando assim as células endoteliais (CE) da vasculatura pré-existente a proliferar e migrar para o tecido hipóxico, por gradiente de VEGF. Posteriormente, as células endoteliais se diferenciam em vários tipos de células envolvidas na formação de vasos sanguíneos (LI et al., 2018).

Ao mesmo tempo, enzimas de remodelação da matriz, particularmente metaloproteinases, medeiam mudanças no microambiente do tumor degradando a matriz extracelular (LI et al., 2018).

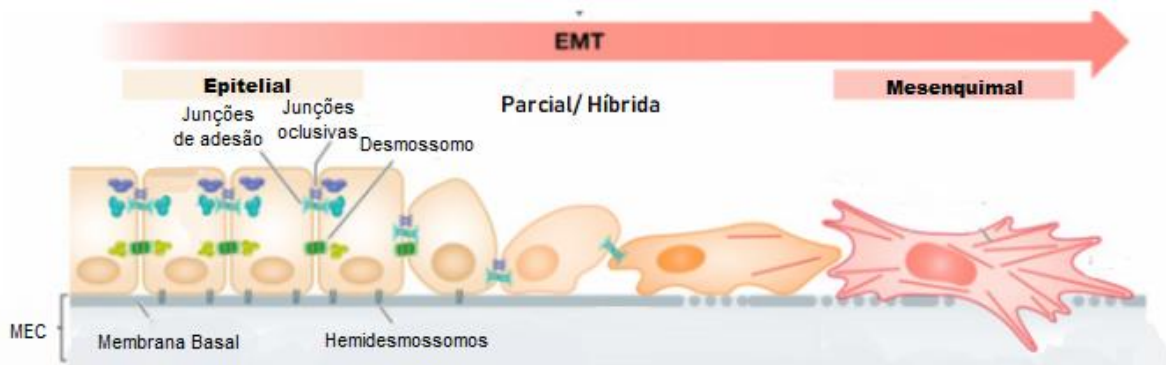
Durante a formação vascular adicional, as células progenitoras endoteliais estão envolvidas na construção da camada interna dos novos vasos sanguíneos. Posteriormente, as CEs se conectam entre si para formar um endotélio contínuo, caracterizado por junções apertadas e complexas e criam alças, por meio de moléculas de adesão, que permitem que o sangue circule, seguidas da construção da membrana basal. Por fim, o vaso está maduro e capaz de transportar oxigênio e nutrição para atender às necessidades dos tecidos tumorais hipóxicos (LI et al., 2018). A vasculatura recém-formada dos tumores primários normalmente tem junções de células endoteliais mais fracas e permeáveis, facilitando a migração transendotelial (TEM) (LOU, 2015).

4.2.1.2 Destacamento de células tumorais

O destacamento de células tumorais depende de modificações na expressão de moléculas de adesão às outras células e ao interstício: alterações na expressão de caderinas e integrinas, com inibição das que mantêm as junções entre as células; além da alteração na expressão de moléculas que aumentam a ancoragem de células à matriz extracelular favorecendo a emissão de pseudópodes para seu deslocamento (LAMBERT et al., 2017; BRASILEIRO FILHO, 2021), tais características são alcançadas através da transição epitélio-mesenquimal (EMT) e exemplificadas na Figura 11.

Na EMT, fatores epiteliais como E-caderina são reprimidos e a expressão de genes associados ao estado mesenquimal, como vimentina e N-caderina, são ativados, levando à diminuição da adesão das células, perda de polaridade e junções apertadas permitindo às células tumorais maior capacidade de motilidade, invasão e migração (BRABLETZ et al., 2021; BRASILEIRO FILHO, 2021; LAMBERT et al., 2017; QUAIL et al., 2013; LU et al., 2019).

Figura 11. Transição epitélio-mesenquimal



Fonte: Adaptado de BRABLETZ et al., 2021

A arquitetura do citoesqueleto de actina nas células submetidas a EMT é reorganizada, permitindo que elas adquiram uma morfologia mesenquimal fusiforme e se tornem capazes de realizar movimentos ameboides, podendo deslocar-se entre fibras da MEC sem destruí-las, orientadas por agentes quimiotáticos com várias origens: na própria célula cancerosa, no estroma, a partir da degradação de componentes da matriz, em células do estroma (BRASILEIRO FILHO, 2021; LU et al., 2019).

A indução de EMT é complexa e envolve sinais originados em diversas vias de TGF- β e IL-6, por exemplo, que ativam fatores de transcrição envolvidos no processo. Fatores ambientais como hipóxia, estressores metabólicos e rigidez da matriz também podem desencadear a EMT em células cancerosas (FARES et al., 2020; LAMBERT et al., 2017).

As células tumorais secretam mais fatores de crescimento epitelial, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), levando a um estado de alta pressão do fluido intersticial hipóxico e ácido no microambiente, que ativa fibroblastos associados ao câncer para produzir mais metaloproteases (MMPs) e remodelar as matrizes extracelulares (MEC) do tumor (HAO *et al.*, 2019).

Dependendo do ambiente extracelular, as células podem exibir modos distintos de EMT que conseqüentemente dão origem a fenótipos diferentes, incluindo comportamentos na progressão e metástase do câncer (LU et al., 2019).

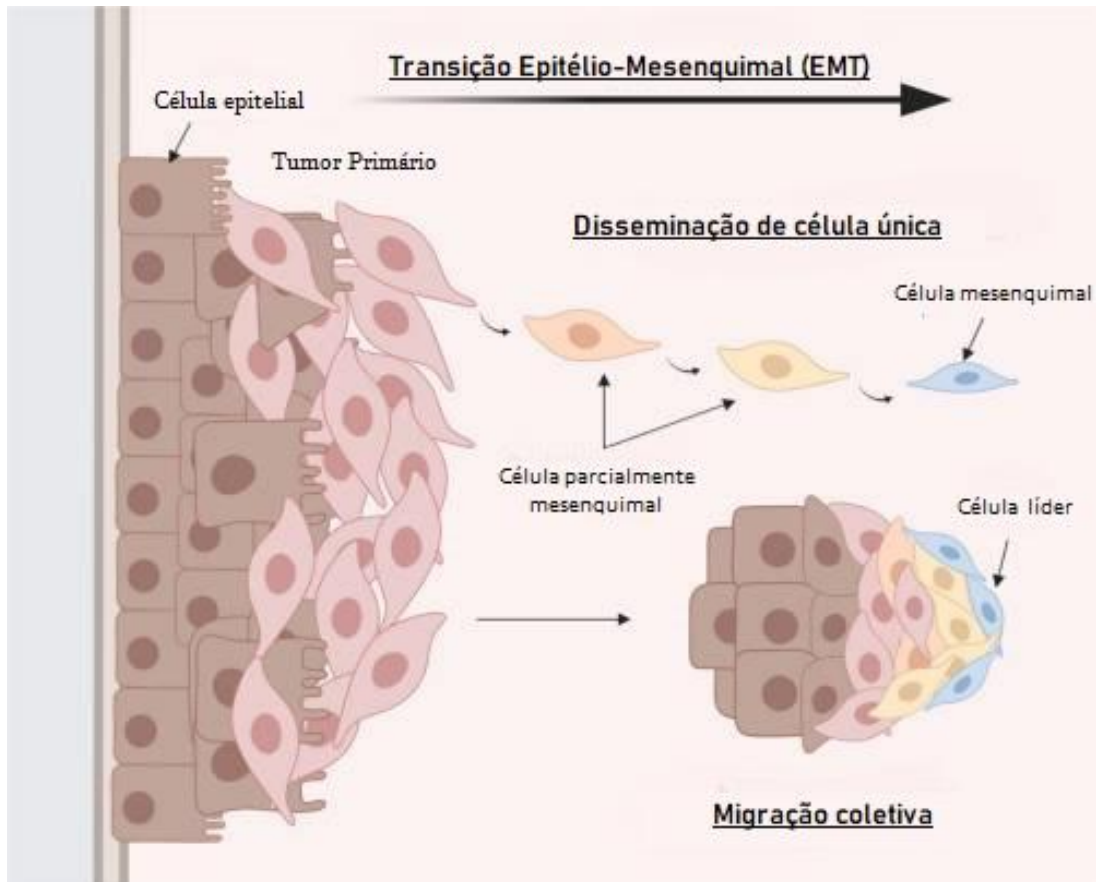
Em tumores epiteliais, o destacamento pode ser feito por meio de células isoladas ou como aglomerados multicelulares, que formam cordões ou faixas de células assim como é apresentado na Figura 12 (FARES et al., 2020; LAMBERT et al., 2017; BRASILEIRO FILHO, 2021).

Nos aglomerados celulares, as células permanecem aderidas umas às outras e invadem a matriz em blocos ou em faixas. As células líderes, localizadas na frente do grupo migratório, sofrem EMT parcial e ganham fenótipo mesenquimal, além de liberar várias metaloproteinases que degradam a matriz extracelular que, de outra forma, impediria o progresso do grupo na totalidade. Simultaneamente, células mais internas apresentam algumas características epiteliais e permanecem ligadas aos seus vizinhos por continuar a expressar marcadores epiteliais como a E-caderina, que ajuda a sustentar a coesão entre as células dentro desses grupos (LAMBERT et al., 2017; LU et al., 2019).

As MMP desestruturam a rede de macromoléculas presentes no caminho, sendo produzidas pelas próprias células tumorais ou por células normais do estroma (fibroblastos, macrófagos) induzidas pelas células malignas. As MMPs regulam a invasão não apenas por remodelamento de componentes insolúveis da membrana basal e matriz intersticial, mas também pela liberação dos fatores de crescimento sequestrados da MEC (KUMAR, 2016).

Em resumo, a migração de uma única célula geralmente requer uma EMT mais completa com adesão celular reduzida e aumento da motilidade individual (LU et al., 2019). Na migração coletiva, as células líderes, localizadas na frente do grupo migratório, sofrem EMT parcial e ganham fenótipo mesenquimal e, simultaneamente, mantêm algumas características epiteliais e permanecem ligadas aos seus vizinhos (LU et al., 2019).

Figura 12. Transição epitelial-mesenquimal (EMT): através da disseminação de uma única célula ou através da migração coletiva.



Fonte: Adaptado de Fares *et al*, 2020.

4.2.1.3 Intravasamento

No intravasamento, as células tumorais deslocam-se em direção aos vasos sanguíneos e linfáticos. Esse movimento parece ser direcionado por citocinas e quimiocinas produzidas por células endoteliais atuando em receptores expressos nas células malignas (BRASILEIRO FILHO, 2021; KUMAR, 2016).

As restrições arquitetônicas do tecido impõem algumas pressões mecânicas nas células tumorais invasoras durante o intravasamento. A compressão nuclear é particularmente desafiadora para a integridade do núcleo da célula invasora, pois pode ocasionar rearranjo genômico, levando ao aumento do potencial metastático (FARES *et al.*, 2020).

Os tumores mais bem-sucedidos podem ser aqueles capazes de adaptar o ambiente aos seus próprios fins (KUMAR, 2016), por exemplo, as células tumorais e estromais produzem efetores parácrinos que atuam em receptores de macrófagos

associados ao tumor, ativando-os a produzir e secretar MMPs, sendo que os produtos dessa clivagem dos componentes da matriz (p. ex., colágeno, laminina) e alguns fatores de crescimento desempenham atividade quimiotática sobre as células tumorais (BRASILEIRO FILHO, 2021).

Os macrófagos também emitem projeções que afastam as células endoteliais e permitem a entrada das células malignas na luz do vaso (BRASILEIRO FILHO, 2021; KUMAR, 2016). A entrada na circulação é também facilitada quando as células tumorais formam a parede de espaços vasculares, dela se destacando com facilidade. Células em bloco penetram principalmente em vasos linfáticos, cuja parede é fenestrada (BRASILEIRO FILHO, 2021).

4.2.1.4 Interações em trânsito

Embora o tempo de trânsito de uma célula cancerosa pela corrente sanguínea até um novo local anatômico distante possa ser de apenas alguns minutos, a passagem é dificilmente garantida, visto que as células tumorais circulantes (CTCs) encontram vários obstáculos no caminho para o parênquima de tecidos distantes, como desafios físicos, que incluem perda de fixação a um tecido, tensão de cisalhamento e a vulnerabilidade a um ataque imunológico, mediado principalmente por células *natural killer* (NK) que as direcionam para morte certa (LAMBERT et al., 2017).

A agregação das células tumorais proporciona alguma proteção contra as células efectoras antitumorais do hospedeiro (BRASILEIRO FILHO, 2021; KUMAR, 2016). Portanto, a sobrevivência de células neoplásicas na circulação é maior quando formam agregados entre si e plaquetas, linfócitos e fibrina, apoiando estudos que demonstram que trombocitopenia ou tratamento com heparina, por exemplo, reduz o número de metástases experimentais (BRASILEIRO FILHO, 2021). Este aspecto facilitador da metástase será detalhado mais adiante no trabalho.

A disseminação de células cancerosas por via linfática representa um importante parâmetro clínico incorporado ao estadiamento histopatológico da doença, estando associado ao prognóstico. Os linfonodos representam becos para células cancerígenas e funcionam principalmente como marcadores que revelam a extensão da disseminação do tumor primário na circulação geral, justificando o porquê da

discussão sobre metástase focar na via hematogênica como principal para colonização de tecidos distantes (LAMBERT et al., 2017)

4.2.1.5 Extravasamento

Os requisitos para o extravasamento bem-sucedido diferem conforme as características de cada tecido. Por exemplo, sinusoides fenestrados da medula óssea e do fígado são mais propensos a permitir a entrada passiva de CTCs (LAMBERT et al., 2017).

No caso do cérebro, a disseminação de células de carcinoma exige a passagem pela barreira hematoencefálica, o que pode exigir a ação de mecanismos complexos diferentes daqueles que permitem a semeadura metastática em outras partes do cérebro (LAMBERT et al., 2017).

4.2.1.6 Colonização metastática

A colonização de tecidos distantes por células tumorais disseminadas é um processo extremamente ineficiente (SUHAIL et al., 2019). Mesmo as células que conseguiram extravasar parecem quase invariavelmente destinadas a serem eliminadas do parênquima tecidual ou a entrar em estado de dormência, no qual persistem por semanas, meses e até anos (LAMBERT et al., 2017).

Longe do tumor primário, as CTCs encontram-se em um novo microambiente tecidual desprovido das células estromais familiares, fatores de crescimento e constituintes da MEC que anteriormente sustentavam a vida de seus progenitores no local primário (LAMBERT et al., 2017). Por isso, o poder de disseminação das células e a capacidade de originar novas colônias estão interligados, embora nem sempre a invasão de tecidos vizinhos implique metastatização (BRASILEIRO FILHO, 2021).

Nos locais metastáticos, as células tumorais precisam recuperar algumas características epiteliais como um passo necessário para o início do crescimento metastático, portanto as células cancerosas sofrem um processo reverso, a transição mesenquimal-epitelial (MET) sob a influência de células estromais, como fibroblastos e células endoteliais (LU et al., 2019).

Tumores induzem a formação de microambientes em órgãos distantes que são propícios à sobrevivência e crescimento de células tumorais antes de sua chegada a

esses sítios. Esses microambientes predeterminados são denominados nichos pré-metastáticos (PMN) (Peinado et al., 2017). O desenvolvimento de um PMN é um processo de várias etapas envolvendo fatores secretados e vesículas extracelulares que induzem vazamento vascular, remodelação da MEC e imunossupressão (FARES et al., 2020).

Exossomos derivados de tumores contendo DNA, mRNAs, microRNAs e proteínas podem interagir com células estromais e endoteliais remodelando a MEC que passa a apresentar proliferação de células estromais aumentadas, migração e sobrevivência de células cancerígenas e resistência aumentada de células tumorais a sinais apoptóticos (FARES et al., 2020) em preparação para a chegada dessas células tumorais (LAMBERT et al., 2017).

Portanto, as células cancerosas metastáticas com as adaptações apropriadas conseguirão colonizar locais distantes com novos microambientes (GANESH et al. 2021).

4.2.1.7 Dormência

A dormência celular é caracterizada pelas células cancerígenas disseminadas que não conseguem formar uma colônia, entrando em estado de latência ou flutuando dinamicamente entre estados latentes e proliferativos. A fase latente é clinicamente inaparente e pode ser resultado da falha das células tumorais em ativar a angiogênese ou em atingir um equilíbrio com outras restrições impostas pelo estroma do hospedeiro, como ausência de fatores requeridos para sobrevivência ou supressão ativa pelo sistema imunológico (GANESH et al. 2021; LAMBERT et al., 2017).

Assim, células cancerígenas que se disseminaram antes da remoção cirúrgica do tumor primário podem persistir em ambientes teciduais distantes como células tumorais disseminadas dormentes (DTCs) (LAMBERT et al., 2017). Os pacientes que abrigam tais reservatórios de células de carcinoma oculto são considerados portadores de doença residual mínima (DRM) assintomática e correm maior risco de eventual recorrência metastática (LAMBERT et al., 2017).

As DTCs devem se proteger do ataque imunológico, visto que estão longe dos limites do microambiente do tumor primário imunossupressor, parte delas conseguem evitar a depuração pelas células NK através da repressão de vários ligantes ativadores de células NK (LAMBERT et al., 2017).

5 EFEITOS MEDIADOS POR PLAQUETAS NA METÁSTASE

Durante o processo de metástase hematogênica, as células tumorais interagem com as plaquetas e seus precursores megacariócitos, auxiliando na seleção para o fenótipo metastático nas células tumorais (LUCOTTI *et al.*, 2020).

Uma série de evidências experimentais destacaram as plaquetas como participantes ativos em todas as etapas da tumorigênese, como angiogênese, proliferação celular, invasão celular e metástase (HAEMMERLE *et al.*, 2018; SABRKHANY, *et al.*, 2021, SMEDA *et al.*, 2020).

Estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que a tumorigênese e a metástase podem ser promovidas por plaquetas por meio de uma ampla variedade de interações entre plaquetas e células cancerígenas (XU *et al.*, 2018).

5.1 HISTÓRICO

Em 1823, Jean-Baptiste Bouillaud descreveu pela primeira vez coágulos sanguíneos associados ao câncer (ROWETH *et al.*, 2020). Em 1865, o médico francês Armand Trousseau observou coagulação sanguínea excessiva em pacientes com carcinoma oculto, inclusive ele próprio, e a definiu como síndrome de Trousseau (LUCOTTI *et al.*, 2020).

Décadas de pesquisa vieram a mostrar uma interação multifacetada entre plaquetas e células tumorais, em que as plaquetas interagem diretamente com as células tumorais na corrente sanguínea e oferecem suporte a muitos aspectos diferentes de sua disseminação (LUCOTTI *et al.*, 2020).

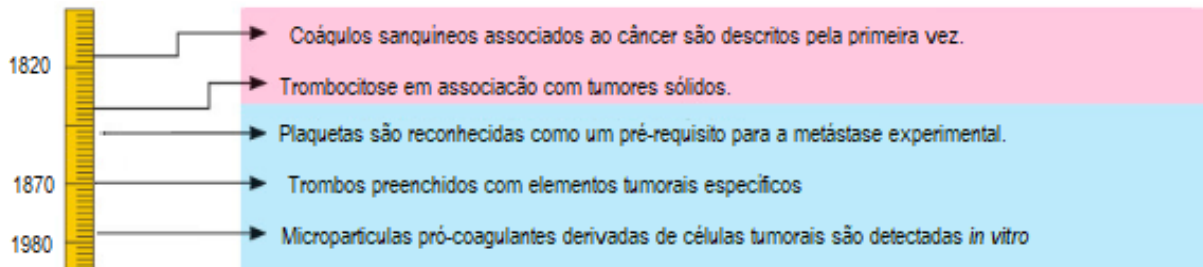
Em 1862, a trombocitose em associação com tumores sólidos foi observada pela primeira vez por Leopold Riess (HAEMMERLE *et al.*, 2018). Em 1877, Billroth descreveu “trombos preenchidos com elementos tumorais específicos” (VELD *et al.*, 2019).

Por volta de 1965, Gasic mostrou pela primeira vez que as plaquetas são um pré-requisito para a metástase experimental. Desde então, numerosos estudos confirmaram a relação entre trombose e metástase (LUCOTTI *et al.*, 2020).

Já em 1981, micropartículas derivadas de células tumorais com propriedades pró-coagulantes puderam ser detectadas *in vitro* (SCHLESINGER, 2018). Desde então, a associação tem sido bem estabelecida, especialmente durante as últimas

décadas, quando evidências sólidas foram geradas a partir de materiais clínicos (LI, 2015). Uma linha do tempo dos principais fatos está representada na Figura 13.

Figura 13. Histórico da associação entre plaquetas e células tumorais



FONTE: VELD *et al.*, 2019.

5.2 TROMBOSE

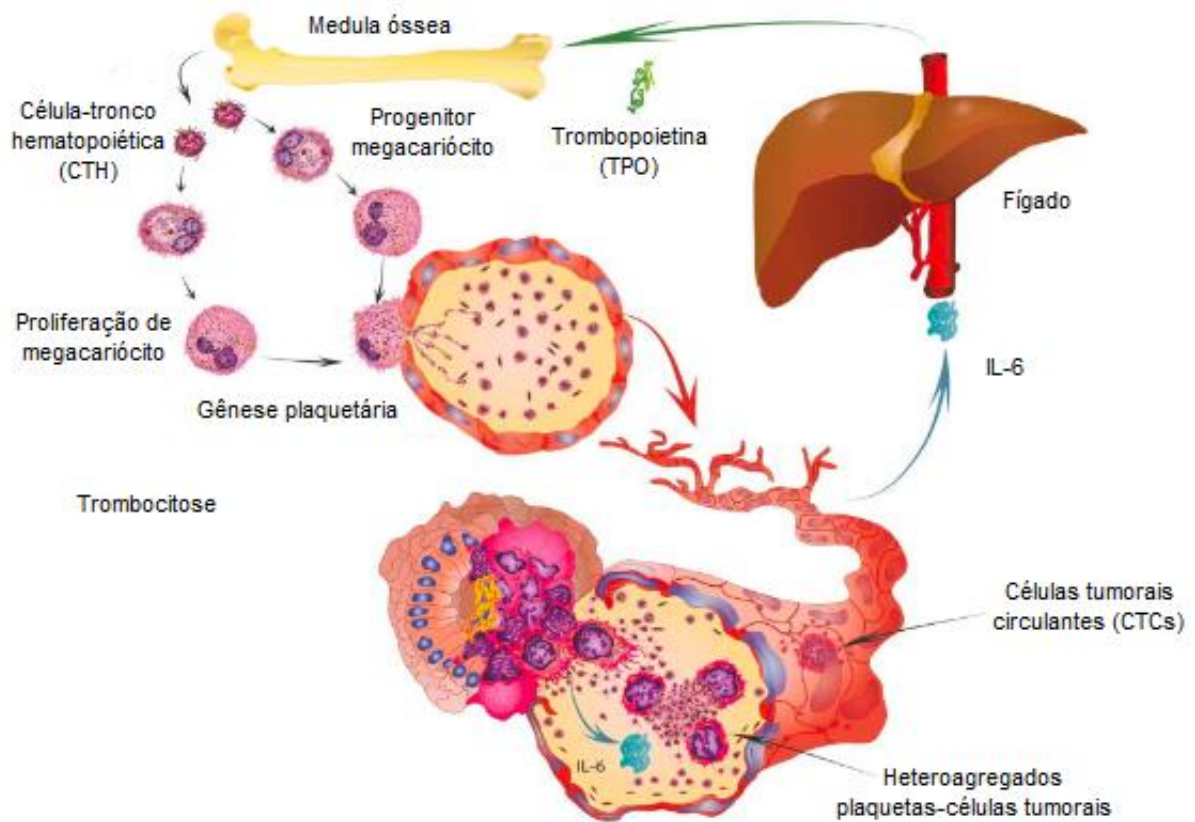
A trombose é considerada uma manifestação clínica comum no câncer, devido a formação aumentada de trombos após a ativação plaquetária induzida pelo tumor (D'AMBROSI *et al.*, 2021). A trombocitose é frequentemente observada em pacientes com tumores malignos metastáticos e uma série de estudos apontou para a correlação positiva entre aumento da contagem de plaquetas e pior prognóstico em vários tipos de câncer (HAEMMERLE *et al.*, 2018; SMEDA *et al.*, 2020).

As plaquetas ativadas estimulam a progressão do câncer em diferentes estágios, ao mesmo tempo, a presença de um tumor tem grande influência nas características plaquetárias, as quais incluem contagem de plaquetas, volume, conteúdo de proteína e mRNA e estado de ativação das plaquetas (SABRKHANY *et al.*, 2021).

O risco de tromboembolismo venoso (TEV), incluindo trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP), está aumentado em até sete vezes em pacientes portadores de câncer em comparação com pacientes sem câncer (LOU *et al.*, 2015).

A produção de plaquetas pode ser fortemente aumentada em resposta a vários fatores sistêmicos e derivados do tumor, como citocinas aumentadas em certos tipos de câncer, como fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e IL-6, assim como mostrado na Figura 14. Também foi relatado que o fator plaquetário 4 (PF4) derivado do tumor ajuda a promover a produção de plaquetas (XU *et al.*, 2018).

Figura 14. Citocinas derivadas de tumor e trombocitose



A IL-6 derivada de células tumorais estimula o fígado a secretar TPO, a qual exerce seu efeito sobre CTHs, resultando em aumento da gênese plaquetária observada em pacientes com câncer. FONTE: Adaptado de HAEMMERLE *et al.*, 2018

Esses fatores podem aumentar a megacariopoiese e a contagem de plaquetas, muitas vezes regulando positivamente os níveis de trombopoietina (HAEMMERLE *et al.*, 2018). A IL-6 derivada do tumor estimula a produção de trombopoietina (TPO) pelo fígado, estimulando assim a megacariopoiese e contribui para a trombocitose paraneoplásica e hipercoagulabilidade em pacientes com câncer (HAEMMERLE *et al.*, 2018; SABRKHANY *et al.*, 2021). Porém, uma questão que ainda gera dúvidas diz respeito sobre a ordem desses eventos (ROWETH *et al.*, 2021), mas de modo geral, pode-se concluir que níveis aumentados de fatores trombopoéticos e números elevados de plaquetas são frequentemente observados em pacientes com câncer (LABELLE *et al.*, 2014).

A contribuição das plaquetas para o aumento do risco de trombose venosa na malignidade não se deve apenas ao aumento do número de plaquetas, mas também

pode estar relacionada à função plaquetária alterada, como exemplo, tem-se o fato das plaquetas de indivíduos com doença metastática em estágio avançado geralmente apresentarem reatividade aumentada ao ADP e à epinefrina (HAEMMERLE *et al.*, 2018). Sinais de ativação plaquetária aberrante, agregação e renovação plaquetária aumentada também podem ser detectados neste cenário (ROVATI *et al.*, 2022).

5.3 MECANISMOS TUMORAIS DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

A complexidade da comunicação entre plaquetas e células cancerígenas ao longo do desenvolvimento do câncer é bem orquestrada e resulta em plaquetas "educadas" pelo tumor que fornecem suporte eficaz para o crescimento do câncer e a disseminação metastática (SMEDA *et al.*, 2020).

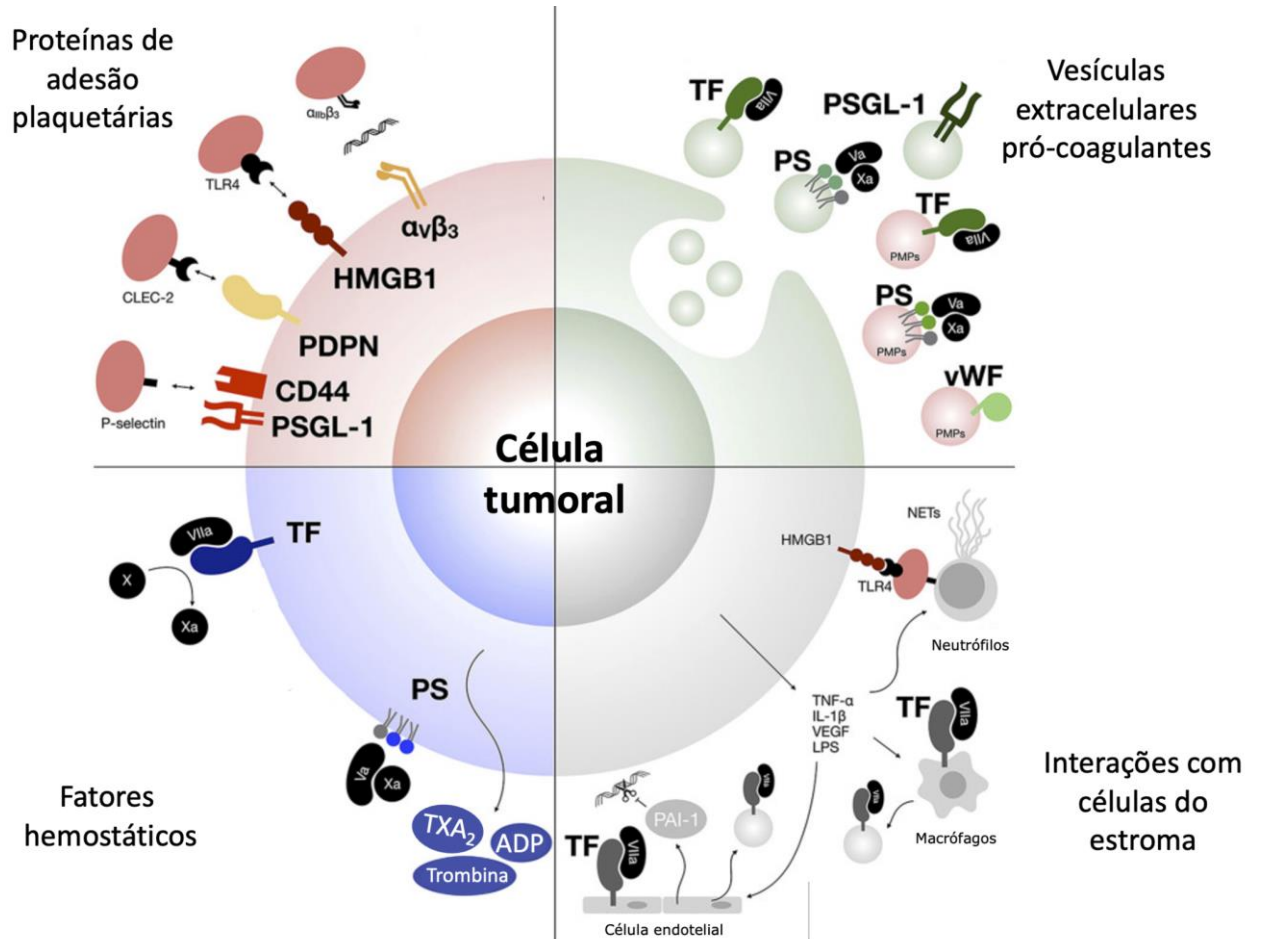
As células cancerígenas podem atrair e conduzir a ativação plaquetária por meio de mecanismos diretos e indiretos estimulando a agregação plaquetária induzida por células tumorais (TCIPA), que também justifica a hipercoagulação e aumento do risco de trombose no câncer (D'AMBROSI *et al.*, 2021; SCHLESINGER, 2018). Dentre os possíveis mecanismos de ativação estão a expressão de fatores hemostáticos e proteínas de adesão, seja na superfície das células tumorais ou pela liberação de vesículas extracelulares e/ou fatores solúveis, que podem ativar os receptores plaquetários, ou ainda pela geração de um nicho pró-trombótico envolvendo células do estroma (D'AMBROSI *et al.*, 2021; JURASZ *et al.*, 2004; LABELLE *et al.*, 2014; LUCOTTI *et al.*, 2020). Todas essas diversas formas de ativação das plaquetas pelas células tumorais estão ilustradas na figura 15.

Em teoria, a TCIPA pode ser alcançada por meio de contato direto plaqueta-célula tumoral ou agregação plaqueta-plaqueta sem envolvimento direto de células tumorais, ou ambas as situações. O primeiro mecanismo envolve a participação de receptores de membrana tanto de plaquetas quanto de células tumorais, e o segundo mecanismo requer a liberação de mediadores solúveis de células tumorais nas proximidades das plaquetas ou a formação de um nicho pró-trombótico (HONN *et al.*, 1992).

De fato, células tumorais injetadas por via intravenosa levam à ativação plaquetária imediata, contribuindo para a liberação de vários fatores pró-tumorigênicos das plaquetas (SMEDA *et al.*, 2020). No entanto, é provável que o envolvimento

dessas várias vias e mecanismos na progressão do tumor seja variável para diferentes tipos de tumor (JURASZ et al., 2004).

Figura 15. Esquema dos mecanismos tumorais de ativação plaquetária direta e indiretamente



PDPN: podoplanina. PS: fosfatidilserina. HMGB1: proteína HMGB1 (do inglês, *High Mobility Group Box Protein*)

FONTE: Adaptado de LUCOTTI et al., 2020

5.3.1 Fatores hemostáticos

Células cancerígenas de diferentes linhagens expressam uma variedade de fatores hemostáticos, os quais podem não apenas serem expressos na superfície das células tumorais, mas também podem ser liberados em sua forma solúvel ou em vesículas extracelulares (EVs) para criar um nicho pró-trombótico (LUCOTTI *et al.*, 2020).

Células tumorais liberam mediadores solúveis como ADP, tromboxano A2 (TXA₂) e trombina para instigar uma ativação plaquetária local que interagem com

receptores plaquetários P2Y₁₂, TP e PARs, respectivamente, para iniciar a agregação plaquetária. Assim, as células tumorais podem induzir a agregação plaquetária também por uma via parácrina (LUCOTTI *et al.*, 2020).

A maioria das linhagens de células cancerígenas expressam constitutivamente fator tecidual (TF) em suas membranas celulares, ativando a cascata de coagulação plasmática e finalmente gerando trombina que, por sua vez, induz a ativação plaquetária (SCHLESINGER, 2018). As células metastáticas expressam níveis até 1.000 vezes mais elevados de TF em comparação com as células não metastáticas (LUCOTTI *et al.*, 2020).

Além de estar envolvida na ativação da cascata de coagulação e das plaquetas, a trombina favorece a proliferação de células tumorais e crescimento, por exemplo, por ativação de vias de sinalização PAR-1 e fibrinogênio (SCHLESINGER, 2018; XU *et al.*, 2018).

As proteínas não são os únicos fatores hemostáticos nas células tumorais; a distribuição assimétrica dos fosfolípidios de membrana nas células cancerígenas também é responsável pela coagulação. A fosfatidilserina (PS), preferencialmente localizada nos folhetos internos das membranas das células eucarióticas normais, foi encontrado altamente exposto no folheto externo das células tumorais e essa exposição está ligada a mutações nas translocases fosfolipídicas, por exemplo a flippase. As células metastáticas têm menor atividade flippase, portanto, maior nível de PS do que suas contrapartes não invasivas. Uma vez no folheto da membrana externa, o PS aniônico cria uma superfície carregada negativamente que se liga aos fatores Va e Xa, iniciando assim a montagem do complexo protrombinase, levando à deposição de trombina e agregação plaquetária (LUCOTTI *et al.*, 2020).

5.3.2 Proteínas de adesão plaquetária

As células tumorais expressam proteínas de ligação que medeiam a ativação direta e a adesão de plaquetas (HONN *et al.*, 1992; LUCOTTI *et al.*, 2020).

O PSGL-1 nas células tumorais interage diretamente com a P-selectina exposta nas plaquetas ativadas. Outras glicoproteínas com estruturas químicas similares a PSGL-1 encontradas na superfície da célula tumoral também demonstraram mediar a adesão à P-selectina expressa por plaquetas (LUCOTTI *et al.*, 2020).

Embora o envolvimento da P-selectina-PSGL-1 exija ativação prévia de plaquetas, a associação direta de células tumorais com plaquetas por meio da

interação P-selectina-PSGL-1 é suficiente para mediar a deposição de fibrina na superfície das células tumorais (LUCOTTI *et al.*, 2020).

A podoplanina (PDPN) é expressa em algumas células tumorais, incluindo câncer escamoso e germinativo, e se liga a CLEC-2 nas plaquetas, enquanto a proteína HMGB1 (do inglês, *High Mobility Group Box Protein*) liberada por células tumorais interage com o TLR4 nas plaquetas. Esses são pares de proteína-ligante de adesão e seu receptor que induzem a ativação e agregação plaquetária ao redor das células tumorais, assim as plaquetas promovem a sobrevivência de células com maior potencial metastático durante seu trânsito hematogênico (LUCOTTI *et al.*, 2020; LI, 2015).

5.3.3 Interação com células de estroma

Além de ativar diretamente as plaquetas, as células cancerígenas promovem um nicho pró-coagulante, alterando o fenótipo trombótico em outras células do estroma e aumentando a liberação de proteínas da MEC e fator tecidual (TF) das células endoteliais, construindo uma superfície ativa para adesão plaquetária e formação de trombos (XU *et al.*, 2018).

Citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) e fatores pró-angiogênicos, como VEGF, liberados por células tumorais induzem a superexpressão de TF por células endoteliais e monócitos e a liberação de VWF por células endoteliais. Além disso, a IL-1 proveniente do tumor induz a secreção endotelial do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), um inibidor da fibrinólise (LUCOTTI *et al.*, 2020).

As citocinas pró-inflamatórias derivadas de células tumorais também induzem um pico de MPs pró-coagulantes expressando TF e PSGL-1 derivadas do estroma, contribuindo para o crescimento do trombo (PALACIOS-ACEDO *et al.*, 2019).

Estudos recentes revelaram que as mucinas de carcinoma iniciam um mecanismo de ativação recíproca em neutrófilos e plaquetas. As mucinas ligam-se à P-selectina em plaquetas e L-selectina em neutrófilos, trazendo ambas as células para as proximidades. Uma interação direta de plaquetas P-selectina e PSGL-1 em neutrófilos induzem a liberação de catepsina G de neutrófilos induzindo ativação plaquetária (SCHLESINGER, 2018).

Assim, as células tumorais possuem várias opções diferentes para induzir a coagulação e a ativação plaquetária em suas proximidades (SCHLESINGER, 2018)

5.3.4 Interações via vesículas extracelulares

Após a ativação plaquetária por células tumorais, a liberação de grânulos de plaquetas é induzida, bem como a liberação de vesículas extracelulares (EVs), como exossomos e micropartículas (XU et al., 2018).

As EVs são um grupo diverso de estruturas secretadas em condições fisiológicas e patológicas por células parenquimais e tumorais transferindo conteúdo de miRNA, DNA, proteína, citocinas, receptores etc. entre células cancerígenas e células do microambiente tumoral, ou seja, atuam como partículas de entrega de sinal transcelular, sendo que suas pequenas dimensões facilitam o movimento de longa distância dentro dos fluídos corporais (ŽMIGRODZKA et al., 2020)

Embora as plaquetas em repouso possam liberar EVs, a maioria são produzidas como resultado da ativação plaquetária e estão envolvidas na expansão do trombo durante a hemostasia através da expressão de PS, TF e vWF em sua superfície. A produção das EVs aumenta durante a ativação celular, estresse oxidativo, hipóxia tecidual e em várias condições de doença (ŽMIGRODZKA et al., 2020). Tumores agressivos estão correlacionados com níveis mais elevados de micropartículas de plaquetas (XU et al., 2018).

A falta de padronização das definições na literatura sobre EVs resulta em inconsistência na classificação de EVs, que geralmente são classificadas conforme o tamanho e origem em microvesículas (MV) (100 nm a 1 μ m) geradas diretamente da membrana plasmática, através do processo de brotamento e exossomos (40 a 100 nm) que se originam na via endocítica, a partir de corpos multivesiculares e grânulos α (D'AMBROSI et al., 2021; LUCOTTI et al., 2020; VELD et al., 2019).

As microvesículas derivadas de plaquetas (PMPs) são a subpopulação de microvesículas mais representada no plasma de indivíduos saudáveis, respondendo por até 90% das MVs circulantes (ŽMIGRODZKA et al., 2020).

PMPs formadas após ativação plaquetária expressam muitas glicoproteínas plaquetárias e contêm proteínas características dos grânulos α de plaquetas ativadas, como trombospondina, fator plaquetário 4 e β -tromboglobulina. Devido à variedade do seu conteúdo, a função dos PMPs é multidirecional e seu efeito depende do tipo de célula-alvo. PMPs induzem a quimiotaxia de monócitos, causam aumento da

expressão do TF na superfície das células endoteliais e influenciam a adesão e proliferação de células normais e neoplásicas (ŻMIGRODZKA *et al.*, 2020).

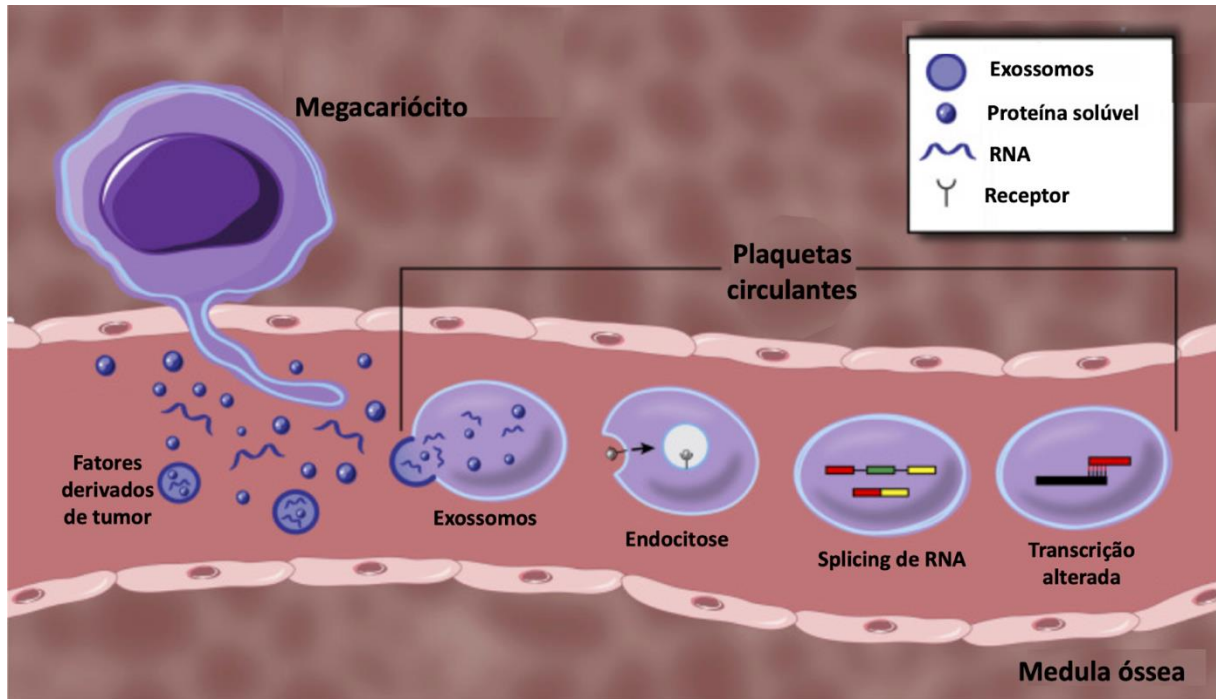
Os PMPs medeiam a sinalização por meio de 2 mecanismos principais: atuando por meio da ativação de receptores presentes na superfície das células-alvo ou transferindo seu conteúdo interno para as células receptoras por associação de membrana ou internalização de PMPs em células-alvo (D'AMBROSI *et al.*, 2021).

Quanto ao segundo tipo de vesículas liberadas tanto por plaquetas quanto por células tumorais, os exossomos, estão envolvidos em várias etapas da progressão do câncer, incluindo angiogênese, migração e invasão celular, imunossupressão e formação do nicho metastático (D'AMBROSI *et al.*, 2021).

5.4 PLAQUETAS EDUCADAS POR CÉLULAS TUMORAIS

As células tumorais podem educar as plaquetas pela alteração do perfil de RNA plaquetário mediante internalização de exossomos oriundos de células cancerígenas, os quais podem exportar miRNAs, RNAs longos codificantes e não codificantes, responsáveis pela indução ou repressão da tradução de proteínas e/ou estimulação de eventos específicos de *splicing* do RNA (D'AMBROSI *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2018; ŻMIGRODZKA *et al.*, 2020), como pode ser observado na Figura 16. Embora não esteja claro como ocorre a captação do exossomo derivado do tumor pelas plaquetas, tanto a fusão da membrana plasmática quanto a endocitose podem estar envolvidas (XU *et al.*, 2018).

Figura 16. Principal mecanismo de geração de plaquetas educadas por tumor.



Fonte: Adaptado de ROWETH *et al.*, 2020

Fatores derivados de tumores também podem alterar o desenvolvimento e a função de megacariócitos dentro da medula óssea, resultando em uma população distinta de plaquetas que entra na circulação (XU *et al.*, 2018). É provável que a maioria do transcriptoma alterado não seja derivado de tumores, mas sim transcritos derivados de megacariócitos alterados em resposta a sinais associados a tumores. Essa alteração do transcrito pode ocorrer já no megacariócito antes da triagem dos transcritos em plaquetas, ou pode ocorrer no interior das plaquetas durante a circulação, ou uma vez em contato com as células tumorais (D'AMBROSI *et al.*, 2021)

5.5 ANGIOGÊNESE E MIGRAÇÃO TRANSENDOTELIAL (TEM)

A angiogênese é um processo limitante na metástase do câncer. A migração transendotelial de células tumorais é dificultada pela tensão imposta pela parede vascular. No entanto, a neovascularização de tumores primários tipicamente tem junções das células endoteliais fracas, de morfologia arredondada e com vazamento, facilitando a migração transendotelial (TEM) (LOU *et al.*, 2015).

A interação de células tumorais com plaquetas induz a liberação seletiva mediante a diferentes estímulos de tantos reguladores pró-angiogênicos quanto anti-angiogênicos. É possível que os tumores sequestram as propriedades angiogênicas

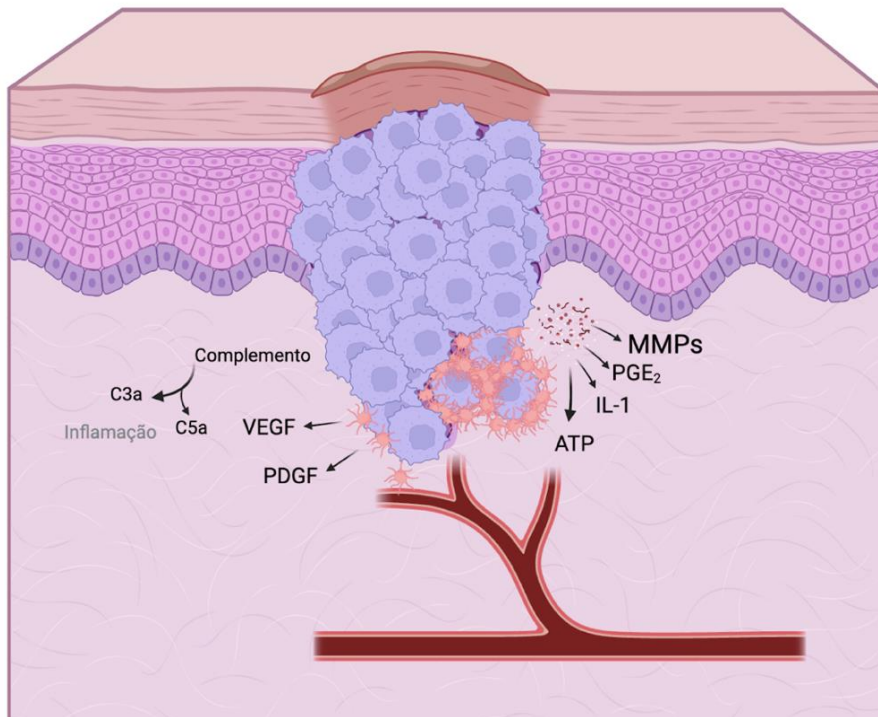
das plaquetas, desencadeando a liberação seletiva de fatores predominantemente pró-angiogênicos (LI, 2015).

A ligação do PAR-1 ao seu agonista trombina, bem como a estimulação do receptor P2Y₁₂ pelo ADP favorece a liberação plaquetária de reguladores pró-angiogênicos de seus grânulos alfa, como o VEGF, um dos mais poderosos reguladores positivos da angiogênese, e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sendo que ambos promovem o crescimento tumoral e a angiogênese (HAEMMERLE *et al.*, 2018; ITALIANO *et al.*, 2008; LOU *et al.*, 2015; LI, 2015).

A trombina também tem vários efeitos nas células endoteliais que suportam a angiogênese, por exemplo, pela potencialização da atividade mitogênica do VEGF nas células endoteliais. Além disso, inibe a apoptose e induz proliferação e diferenciação de células progenitoras vasculares (SCHLESINGER, 2018).

Como já mencionado anteriormente, as células cancerígenas metastáticas podem ativar plaquetas, aumentando a concentração de PMPs, que podem fornecer fatores pró-angiogênicos (LOU *et al.*, 2015; SCHLESINGER, 2018). Acredita-se que os miRNAs derivados de EVs também consigam regular a expressão gênica em células endoteliais e potencialmente impactar a neovascularização (SCHLESINGER, 2018). Além disso, EVs circulantes podem regular positivamente o nível de matriz metaloproteinase 2 (MMP2) em células de câncer de próstata e facilitando o intravasamento de células cancerígenas metastáticas (ITALIANO *et al.*, 2008; LOU *et al.*, 2015).

Figura 17. Interação de plaquetas com células tumorais no nicho primário acarreta liberação de moléculas bioativas que auxiliam na EMT



Fonte: Adaptado de HAEMMERLE *et al.*, 2018.

Como mostrado na Figura 17, as células tumorais liberam complemento, C3a e C5a, prostaglandina E2 (PGE₂), IL-1 α e metaloproteases da matriz que auxiliam na TEM de células cancerígenas através do endotélio, tanto para dentro quanto para fora de vasos sanguíneos (HAEMMERLE *et al.*, 2018; SCHLESINGER, 2018).

5.6 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL

Durante o processo metastático, as células tumorais se desprendem do tumor primário e entram na corrente sanguínea, porém antes disso, as células neoplásicas podem sofrer transição epitelial-mesenquimal (EMT), que consiste na interrupção das interações célula-célula, expressão de marcadores de fenótipo mesenquimal, aumento da mobilidade e maior capacidade de invadir sítios distantes (D'AMBROSI *et al.*, 2021). A EMT também confere às células tumorais maior resistência à depuração imune e à quimioterapia (LU *et al.*, 2019).

Células com características EMT são muitas vezes capazes de degradar e invadir sua matriz extracelular basal expressando MMPs. Dependendo do ambiente extracelular e do estado do tecido, as células podem exibir modos distintos de EMT

que subsequentemente dão origem a fenótipos muito diferentes, interferindo nos comportamentos na progressão do câncer e metástase (LU *et al.*, 2019).

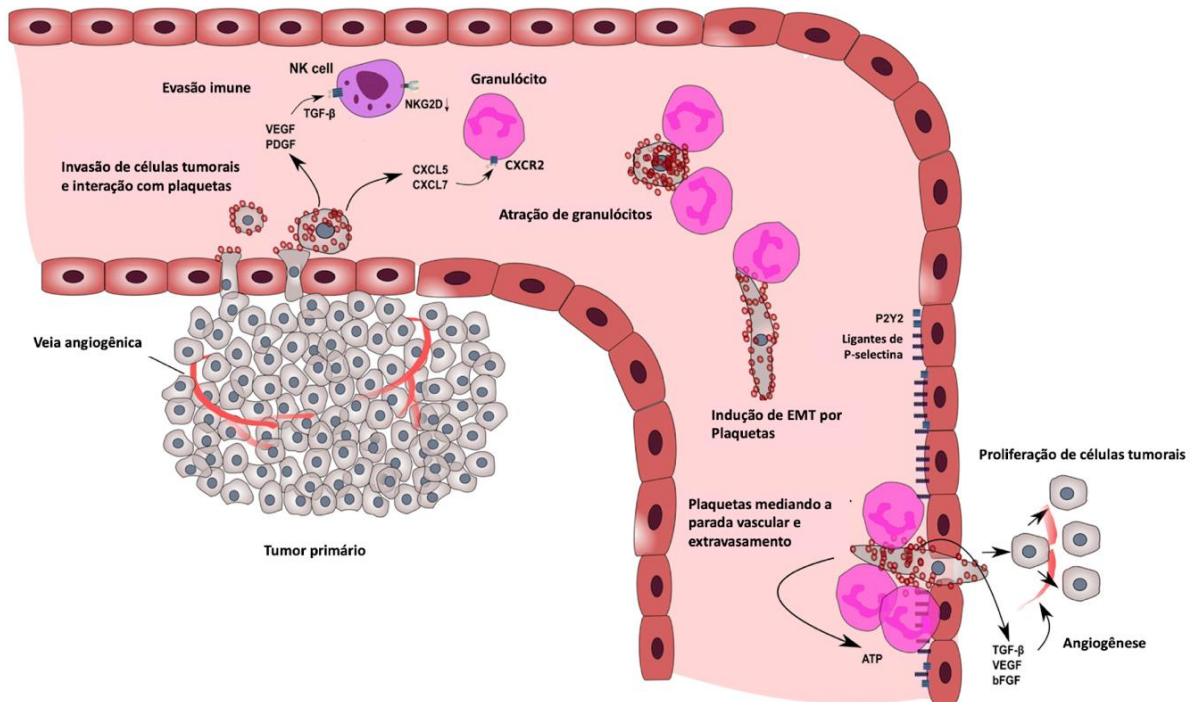
A interação plaqueta-célula cancerosa e o TGF- β derivado de plaquetas pode ativar sinergicamente as vias TGF- β /*Smad* e a via de transcrição do fator nuclear κ B (NF- κ B) em células cancerígenas, promovendo EMT *in vivo* e aumentando proliferação de células cancerígenas (D'AMBROSI *et al.*, 2021; HAEMMERLE *et al.*, 2018). Plaquetas ativadas secretam TGF- β , que ativa a via TGF β /*Smad* nas células tumorais. O TGF- β é uma citocina multifuncional que provoca uma ampla gama de respostas celulares dependentes do contexto e que pode atuar como um potente supressor de tumor em tipos de células epiteliais normais e pré-malignas, desencadeando a parada do ciclo celular na fase G1 por diferentes mecanismos em diferentes tipos de células. Além da parada do ciclo celular, o TGF- β pode induzir a apoptose celular na fase inicial da tumorigênese, além da ativação da autofagia em certas células cancerígenas humanas (HAO *et al.*, 2019). Por outro lado, na matriz extracelular TGF- β estimula a angiogênese, inibe o sistema imune e propicia um ambiente favorável para a migração da célula tumoral e metástase (KIMURA *et al.*, 2017).

O alto nível de plasticidade permite que a EMT seja facilmente reversível para permitir o desenvolvimento de macrometástase durante a progressão maligna (LU *et al.*, 2019).

5.7 HETEROAGREGADOS E EVASÃO IMUNE

Depois que as células cancerígenas escapam de seu microambiente e entram na circulação sanguínea, elas são expostas a uma alta tensão de cisalhamento e ao ataque do sistema imunológico, em especial, células NK. Sem proteção, menos de 0,1% das células cancerígenas na circulação sanguínea sobreviveriam (D'AMBROSI *et al.*, 2021). As ações mediadas pelas plaquetas auxiliando na sobrevivência das células tumorais metastáticas estão resumidas na Figura 18.

Figura 18. Esquema dos efeitos mediados pelas plaquetas durante trânsito das células tumorais



Fonte: Adaptado de SCHLESINGER, 2018

Diante do exposto, subseqüentemente à ativação plaquetária, células tumorais, plaquetas e leucócitos, como neutrófilos e linfócitos isolados, formam heteroagregados usando diversos receptores de adesão (SCHLESINGER, 2018).

Essa interação física das células cancerígenas com as plaquetas é mediada principalmente via GPIb-IX-V, GPIIb-IIIa e integrinas de células tumorais como a integrina $\alpha\beta 3$ em como P-selectina (HAEMMERLE *et al.*, 2018). Mas, pode-se dizer que as duas principais moléculas de adesão que suportam a adesão plaqueta-célula cancerígena são P-selectina e GPIIb/IIIa (LI, 2015). A inibição da P-selectina bloqueou o acúmulo de leucócitos em um trombo em crescimento, bem como deposição de fibrina, exibindo o papel crucial das P-selectinas na coagulação e recrutamento de leucócitos (SCHLESINGER, 2018).

Ainda sobre a constituição dos heteroagregados, a expressão de TF por plaquetas e células tumorais coopera para aumentar a deposição de fibrina ao redor dos heteroagregados (LI, 2015).

Esse revestimento plaquetário das células tumorais na corrente sanguínea promove a conclusão bem-sucedida de várias etapas da cascata metastática (LUCOTTI *et al.*, 2020), pois forma um manto protetor que ajuda as células

cancerígenas a escapar da vigilância imunológica e da citólise mediada por células NK e medeiam a parada do êmbolo plaquetário das células tumorais na parede vascular (LI, 2015; ROVATI *et al.*, 2022; SCHLESINGER, 2018).

Além da dificuldade de acesso, por si só, conferir proteção às células tumorais em heteroagregados, as plaquetas também realizam a transferência de proteínas imunorreguladoras para a superfície de células tumorais por contato direto, o que finalmente leva a um fenótipo MHC classe I positivo prejudicando a indução da atividade de reconhecimento e citotoxicidade das células NK. Esse mecanismo é chamado “mimetismo plaquetário”, no qual as células tumorais expressam produtos específicos de plaquetas ou megacariócitos, como GPIIb/IIIa, PARs e molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (PECAM1) etc. que facilitam a disseminação (HAEMMERLE *et al.*, 2018; LOU *et al.*, 2015; SCHLESINGER, 2018).

Além disso, o revestimento protetor das plaquetas fornece fatores promotores de crescimento essenciais para a proliferação de células tumorais e vasos (FABRICIUS *et al.*, 2021). A formação de heteroagregados também desencadeia várias vias de sinalizações específicas, que contribuem para a liberação de uma infinidade de fatores derivados de plaquetas, como interferon- γ (IFN- γ), TGF- β 1, PDGF que induzem EMT em CTCs. Além disso, o TGF- β derivado de plaquetas diminui a atividade antitumoral das células NK pela regulação negativa do imunorreceptor NKG2D (HAEMMERLE *et al.*, 2018; SCHLESINGER, 2018).

5.8 ADESÃO E EXTRAVASAMENTO

A interação entre as células tumorais e o endotélio microvascular ocorre antes do extravasamento bem-sucedido e da TEM para formar metástases. Experimentos *in vivo* indicam que a adesão de células tumorais aos vasos foi significativamente aumentada por plaquetas, bem como a estabilização e retenção de células cancerígenas na vasculatura (HAEMMERLE *et al.*, 2018; LI, 2015).

Embora esse processo seja mediado principalmente pela interação de receptores de adesão entre CTCs e CEs, as plaquetas podem servir como um potente regulador desse processo (LOU *et al.*, 2015).

As complexas interações células tumorais-CEs podem ser analisadas no nível molecular pela hipótese de 'ancoragem e bloqueio' proposta por Chen e Honn. De acordo com esta hipótese, a adesão de células tumorais às células endoteliais do órgão-alvo inclui uma etapa de reconhecimento inicial, também chamada

“ancoragem”, seguida por uma etapa de bloqueio ou adesão firme de fase tardia (HONN et al., 1992).

A etapa de "ancoragem" é geralmente mediada por mecanismos de adesão relativamente fracos e transitórios envolvendo interações carboidrato-carboidrato e/ou carboidrato-proteína, enquanto a etapa de "bloqueio" é mediada por integrinas dependentes de ativação (HONN et al., 1992).

Após a ativação plaquetária, a P-selectina dos grânulos α é translocada às superfícies das plaquetas e através da interação com seus ligantes medeia a amarração inicial das células tumorais às células endoteliais, facilitando o extravasamento de células tumorais para a matriz subendotelial (SCHLESINGER, 2018).

A transição do estado de 'ancoragem' para o estado de 'bloqueio' é mediada por uma série de fatores reguladores derivados de células tumorais, plaquetas, CEs e muitas outras células (HONN et al., 1992; SCHLESINGER, 2018).

As plaquetas conjugadas com células cancerígenas liberam outros mediadores armazenados em grânulos α e δ que regulam a permeabilidade dos vasos, incluindo os metabólitos eicosanoides TXA2 e ácido hidroxieicosatetraenoico (12-HETE), além de ATP, histamina e serotonina, os quais induzem a retração das células endoteliais, expõem a membrana basal e, assim, facilitam o extravasamento e metástase das células cancerígenas (LI, 2015). O ATP derivado de plaquetas induz o relaxamento das junções endoteliais e a permeabilidade vascular ao ativar os receptores purinérgicos endoteliais P2Y2 (SCHLESINGER, 2018)

5.9 FORMAÇÃO DE NICHOS SECUNDÁRIOS

As plaquetas podem ainda orientar a formação de um nicho pré-metastático pela secreção da quimiocinas CXCL5 e CXCL7 e, assim, aumentar o recrutamento de granulócitos e células hospedeiras para construir o microambiente tumoral, portanto as plaquetas criam um ambiente rico em células imunes ao redor das metástases em desenvolvimento, a fim de apoiar a proliferação e a sobrevivência das células tumorais (BRAUN et al., 2021; HAEMMERLE *et al.*, 2018).

O fator 1 derivado do estroma (SDF-1) secretado dos grânulos de plaquetas suporta o direcionamento de células progenitoras hematopoiéticas para locais de neovascularização em tumores e tecidos isquêmicos (HAEMMERLE *et al.*, 2018).

As plaquetas também liberam fatores pró-angiogênicos em um estágio posterior para induzir a formação de vasos tumorais locais dentro do microambiente hospedeiro. A capacidade de formar vasos sanguíneos em órgãos distantes é importante para a colonização e depende não apenas do VEGF, mas também do PDGF (BRAUN *et al.*, 2021).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plaquetas possuem papel ativo na progressão metastática. As propriedades de superfície e dos grânulos plaquetários são explorados pelas células tumorais em diversas etapas da cascata metastática, como angiogênese, formação de heteroagregados, evasão imune, transição epitélio-mesenquimal, transmigração e formação no nicho metastático secundário. A comunicação entre plaquetas e as células tumorais é bidirecional, com as primeiras estimulando a progressão do câncer em diferentes estágios e as células tumorais afetando a contagem de plaquetas, o estado de ativação e o transcriptoma.

Conhecer os mecanismos envolvidos na ativação plaquetária pelas células tumorais, ou mesmo outros mecanismos dependentes de plaquetas importantes no processo de metástase, pode ser essencial na busca por novas terapias que podem ser associadas às formas de tratamentos tradicionais. Além disso, os mecanismos moleculares das interações plaquetas-células tumorais podem ser explorados na busca por biomarcadores sanguíneos do câncer em seus estágios iniciais.

As drogas antiplaquetárias ainda não fazem parte dos protocolos farmacológicos de rotina de prevenção e tratamento do câncer, mas diante das evidências da participação das plaquetas na metástase bem-sucedida e da trombocitose como um marcador de pior prognóstico em pacientes com tumores sólidos, os dados experimentais sugerem que estratégias que visam reduzir a ativação, atividade ou número de plaquetas podem ser exploradas como terapias antimetastáticas, visto que podem reduzir o crescimento do tumor e a metástase, levando a melhores resultados no tratamento da doença, sendo que entre os antiplaquetários a serem explorados estão desde os inibidores da cicloxigenase, como a aspirina, às tienopiridinas que têm como alvo receptores de superfície das plaquetas.

Portanto, parece ser apenas questão de tempo até que novos e maiores estudos clínicos sejam realizados para maior compreensão da possibilidade de os antiplaquetários atuais poderem oferecer esse novo benefício e ainda, para quais formas específicas de câncer isso seria válido, qual a dose e duração a ser recomendada, quais as possíveis reações adversas dessa aplicação.

REFERÊNCIAS

- ANVARI, Sina; OSEI, Ernest; MAFTOON, Nima. Interactions of platelets with circulating tumor cells contribute to cancer metastasis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-16, Jul. 2021.
- AZEVEDO, Maria Regina Andrade de. **Hematologia Básica**: fisiopatologia e diagnóstico laboratorial. 6. ed. Rio de Janeiro: Thieme Revinter, 2019.
- BRABLETZ, Simone et al. Dynamic EMT: a multitool for tumor progression. **The Embo Journal**, [S.L.], v. 40, n. 18, p. 361-374, Aug. 2021.
- BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo Patologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. 1553 p.
- BRAUN, Attila *et al.* Platelet-Cancer Interplay: molecular mechanisms and new therapeutic avenues. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 11, p. 1-27, jul. 2021.
- D'AMBROSI, Silvia *et al.* Platelets and tumor-associated RNA transfer. **Blood**, [S.L.], v. 137, n. 23, p. 3181-3191, May 2021.
- ESTEVEZ, Brian *et al.* New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. **Physiology**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 162-177, mar. 2017.
- FABRICIUS, Hans-Åke et al. The Role of Platelet Cell Surface P-Selectin for the Direct Platelet-Tumor Cell Contact During Metastasis Formation in Human Tumors. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-23, 15 mar. 2021.
- FARES, Jawad et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-25, 12 Mar. 2020
- FERREIRA, Cláudia Natália *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010. Elsevier BV.
- FRANCO, Aime T.; CORKEN, Adam; WARE, Jerry. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. **Blood**, [S.L.], v. 126, n. 5, p. 582-588. Jul. 2015.
- FRANCO, Marcello et al. **Patologia: processos gerais**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 362 p.
- FRELINGER, Andrew; MICHELSON, Alan; GREMMEL, Thomas. Platelet Physiology. **Seminars In Thrombosis and Hemostasis**, [S.L.], v. 42, n. 03, p. 191-204, Fev. 2016.
- FRITSMA, George A. Platelet Structure and Function. **Clinical Laboratory Science**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 125-131, 2015.
- GLADER, Bertil E. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 14. ed. Philadelphia. Wolters Kluwer, 2018. 2346 p.
- GIBBINS, Jonathan M.; MAHAUT-SMITH, Martyn. **Platelets and Megakaryocytes**. vol. 1. [S.L.]: Humana, 2004. 404 p.

GANESH, Karuna; MASSAGUÉ, Joan. Targeting metastatic cancer. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 27, n.1, p. 34–44, Jan. 2021.

GOLEBIEWSKA, Ewelina M.; POOLE, Alastair W. Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. **Blood Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 153-162, May. 2015.

HAEMMERLE, Monika *et al.* The Platelet Lifeline to Cancer: challenges and opportunities. **Cancer Cell**, [S.L.], v. 33, n. 6, p. 965-983, Jun. 2018.

HAO, Yang *et al.* TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 2767, Jun. 2019.

HOLINSTAT, Michael. Normal platelet function. **Cancer And Metastasis Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 195-198, Jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Brasil - estimativa de casos novos. Rio de Janeiro: INCA, mai. 2020.

JURASZ, Paul *et al.* Platelet-cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. **British Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 143, n. 7, p. 819-826, dez. 2004.

KAPUR, Rick *et al.* Nouvelle Cuisine: platelets served with inflammation. **The Journal of Immunology**, [S.L.], v. 194, n. 12, p. 5579-5587, 5 jun. 2015

KLEIN, Christoph A. *et al.* Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 681-694, 6 out. 2020.

KOUPENOVA, Milka *et al.* Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. **Circulation Research**, [S.L.], v. 122, n. 2, p. 337-351, Jan. 2018.

KUMAR, Vinay V. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 1440 p.

LABELLE, Myriam *et al.* Platelets guide the formation of early metastatic niches. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 111, n. 30, p. 3053-3061, Jul. 2014.

LAMBERT, Arthur W. *et al.* Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, [S.L.], v. 168, n. 4, p. 670-691, fev. 2017.

LAZAR, Sophia; GOLDFINGER, Lawrence E. Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer. **Blood**. [S.L.], v. 137, n. 23, p. 3192-3200, Jun. 2021.

LEWANDOWSKA, Anna *et al.* Environmental risk factors for cancer – review paper. **Annals Of Agricultural And Environmental Medicine**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 1-7, Mar. 2019.

LI, Nailin et al. Platelets in cancer metastasis: to help the .:villain:: to do evil. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 138, n. 9, p. 2078-2087, Sept. 2015.

LOU, Xiao-Liang et al. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. **Chinese Journal of Cancer Research**, [S.L.]. Apr. 2015.

LUCOTTI, Serena et al. Platelets and Metastasis: new implications of an old interplay. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 10, p. 1-23, Sept. 2020.

LU, Wei *et al.* Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. **Developmental Cell**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 361-374, May. 2019.

MAMMADOVA-BACH, Elmina et al. Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived Galectin-3. **Blood**, [S.L.], p. 1146-1160, Fev. 2020.

MANDEL, Jonathan et al. Beyond Hemostasis: platelet innate immune interactions and thromboinflammation. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 3868, 31 mar. 2022.

MICHELSON, Alan. S. **Platelets**. 4. ed. United States of America. Academic Press, 2019. 1268 p.

PALACIOS-ACEDO, Ana Luisa et al. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: collaborating with the enemy. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 2-22, 31 jul. 2019.

PEINADO, Héctor; et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 302-317, Mar. 2017.

QUAIL, Daniela F et al. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 1423-1437, Nov. 2013.

ROVATI, Gianenrico *et al.* Antiplatelet Agents Affecting GPCR Signaling Implicated in Tumor Metastasis. **Cells**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 725-750, Feb. 2022.

ROWETH, Harvey G. *et al.* Lessons to learn from tumor-educated platelets. **Blood**, [S.L.], v. 137, n. 23, p. 3174-3180, May. 2021.

SABRKHANY, Siamack *et al.* Platelets as messengers of early-stage cancer. **Cancer And Metastasis Reviews**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 563-573, Fev. 2021.

SCHLESINGER, Martin. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. **Journal Of Hematology & Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-15, Oct. 2018.

SEMPLE, John W. et al. Platelets and the immune continuum. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 264-274, May. 2011

SMEDA, Marta *et al.* The endothelial barrier and cancer metastasis: does the protective facet of platelet function matter? **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 176, n. 0, p. 113886, Jun. 2020.

STEGNER, David; NIESWANDT, Bernhard. Platelet receptor signaling in thrombus formation. **Journal Of Molecular Medicine**, [S.L.], v. 89, n. 2, p. 109-121, Nov. 2010

SUHAIL, Yasir et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Systems**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 109-127, Aug. 2019.

TAO, Derrick L. *et al.* Aspirin and antiplatelet treatments in cancer. **Blood**, [S.L.], v. 137, n. 23, p. 3201-3211, May. 2021.

TERUEL, José Antonio Lozano. **Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud**. 2. ed. Espanha: Mcgraw-hill Interamericana. 2004. 522 p.

VELD, Sjors G. J. G. In 'T *et al.* Tumor-educated platelets. **Blood**, [S.L.], v. 133, n. 22, p. 2359-2364, May 2019.

WANG, Lei *et al.* Emerging roles of platelets in cancer biology and their potential as therapeutic targets. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-14, 22 jul. 2022.

YEUNG, Jennifer; LI, Wenjie; HOLINSTAT, Michael. Platelet Signaling and Disease: targeted therapy for thrombosis and other related diseases. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 526-548, Jun. 2018.

YOUNG, Shauna; POULSEN, Keila. Anderson's Atlas of Hematology. 2. ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 589 p.

YUN, Seong-Hoon *et al.* Platelet Activation: the mechanisms and potential biomarkers. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2016, p. 1-5, Jun. 2016

XU, Xiaohong Ruby *et al.* Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents. **Blood**, [S.L.], v. 131, n. 16, p. 1777-1789, Apr. 2018.

ŻMIGRODZKA, Magdalena et al. Platelets Extracellular Vesicles as Regulators of Cancer Progression—An Updated Perspective. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 15, p. 5195, 22 jul. 2020.