

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



## **A importância do microambiente tumoral na carcinogénese**

**Marlene Coelho Camacho Francês**

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Rita Estrela Rodrigues Conde,  
Professora Auxiliar

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2024**

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



## **A importância do microambiente tumoral na carcinogénese**

**Marlene Coelho Camacho Francês**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à  
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Rita Estrela Rodrigues Conde,  
Professora Auxiliar

**2024**

# Agradecimentos

Esta caminhada começou com um sonho, e uma promessa...

O sonho, foi muitas vezes um grande pesadelo; a promessa cumpre-se...

À força incomensurável que habita e rege a vida e a morte, e a quem chamam Deus,

Aos meus pais, de maneira particular à minha Mãe

Ao Vítor meu esposo e aos meus filhos, o Vítor e a Vitória

E citando Bernardo Chartres, e Isaac Newton

“nanos gigantum humeris incidentes”

aos Ilustres Professores e mentores da Faculdade de Farmácia, que em momentos chave do meu processo de passagem por esta academia, “agarrando-me”, ensinaram, o que significa resiliência, persistência e superação,

Professora Doutora Ana Rita Conde,

Professora Doutora Quirina Costa

Professora Doutora Ana Lídia Pinheiro

Professor Doutor Joao Pinto,

Professora Doutora Maria João Gama,

Professor Doutor Nuno Silva

Professor Doutor Rui Loureiro

Professora Doutora Carla Torre

Professor Doutor António Alfaia

Professor Doutor Bruno Sepodes

Professora Doutora Cecília Rodrigues

Professora Doutora Ana Paula Francisco

Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro

Carla Moreira, amiga e colega de curso em todas as horas

e todos os outros, aqui não nomeados, mas decisivos, a minha infinita gratidão.

## **Declaração Código de Conduta**

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa.

Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria

# Resumo

O microambiente tumoral desempenha um papel fundamental na iniciação e na progressão da carcinogénese.

O habitat característico do microambiente tumoral, intensamente dinâmico e heterogéneo, envolvendo células imortais, células do estroma, células imunitárias, vasos sanguíneos, matriz extracelular e sinalização molecular permite definir a carcinogénese como uma doença do microambiente tumoral; as intrincadas e complexas interações entre todos os componentes celulares influenciam o crescimento do tumor, a invasão de tecidos adjacentes, e o processo de metastização.

Elementos críticos característicos do microambiente tumoral como a hipoxia, inflamação, e evasão imunológica modelam a forma e expressão do comportamento e gravidade do tumor na resposta às terapias existentes.

Os fibroblastos tumorais associados ao cancro, que se encontram no microambiente tumoral, são fundamentais na sua ação pro-tumoral, na remodelação da matriz extracelular (ECM) e na secreção de fatores de crescimento que ativam a angiogénese e a proliferação das células tumorais.

Os macrófagos tumorais, outras células imunológicas e componentes do microambiente adquirem fenótipos pró-tumorais, que permitem a evasão de células cancerígenas à vigilância imunológica

As condições de hipóxia, e a sobre expressão dos fatores de transcrição que respondem á diminuição dos níveis de oxigenação infratumoral características do microambiente tumoral, agravam a instabilidade e a resistência á apoptose e adicionalmente, promovem a angiogénese e modelação das vias metabólicas intracelulares.

A inflamação crónica característica dos ambientes microtumoriais ancora um ambiente permissivo e potenciador da sobrevivência e proliferação das células metastizadas.

O Microambiente tumoral contribui para resistência às abordagens terapêuticas existentes, já que atua como barreira á ação dos fármacos, e simultaneamente, potencia os mecanismos de resistência das células, promovendo a metastização.

Compreender as relações e os papeis de cada componente do microambiente tumoral e a sua relação com a carcinogénese permitirá desenvolver estratégias terapêuticas mais eficientes e adequadas garantindo o tratamento e o aumento da sobrevida dos doentes.

**Palavras-chave:** Microambiente tumoral; carcinogénese, evasão imunológica, células associadas ao cancro, hipóxia.

# Abstract

The tumor microenvironment plays an essential role in the initiation and progression of carcinogenesis.

*Tumor microenvironment* characteristic habitat, intensely dynamic and heterogeneous, involving immortal cells, stromal cells, immune cells, blood vessels, extracellular matrix and molecular signaling allows defining carcinogenesis as a tumoral microenvironment disease; the intricate and complex interactions between all cellular components influence tumor growth, invasion of adjacent tissues, and the process of metastasis.

Critical elements characteristic of the tumor microenvironment, such as hypoxia, inflammation, immune evasion, model the form, expression, and tumor's behavior and severity, towards therapies.

*Cancer associated tumor fibroblasts*, are cardinal in their pro-tumor action, in remodeling of extracellular matrix and in growth factors' secretion thus promoting angiogenesis and tumor cell's grow.

*Tumor associated macrophages*, other immune cells and TME components acquire pro-tumor phenotypes, which allow the evasion of cancer cells to immunological surveillance.

Hypoxia habitat, and the overexpression of the transcription-factors increases apoptosis's instability and resistance, additionally, promotes angiogenesis and intracellular metabolic pathways' remodeling.

Chronic inflammation, a microtumor environments' character anchors a permissive environment and enhances metastatic cell's survival and proliferation.

*Tumoral Microenvironment* acts as a barrier to drug's delivery conventional therapeutic approaches, simultaneously, increases cell's resisting mechanisms, promoting metastasis.

Understanding the deep interplays of *Tumoral Microenvironment* cellular's components and carcinogenesis allows the development of more efficient and appropriate therapeutic strategies, providing pharmacological efficacy and increase patients' survival.

**Keywords:** *tumoral microenvironment; carcinogenesis, Immunological evasion, cancer associated cells, hypoxia.*

# Abreviaturas

TME- *Tumoral microenvironment*

CAF's- *cancer-associated fibroblasts*

MAFt -*melanoma associated fibroblasts*

HIFs-*hypoxic inducible factors*

TGF- $\beta$ -fator de crescimento transformador beta

MMP's-*matrix metalloproteinases*

Wnt/B-*catenine signaling pathway*

MAPK-*mitogen-activated protein kinase*

EGFR-recetor do fator de crescimento epidérmico

JAK/STAT- *Janus kinase*-tradutores de sinal e ativadores da transcrição

NF- $\kappa$ B- fator nuclear Kappa-light chain enhancer das células B ativadas

ECM- *extracellular matrix*

EMT-*epithelial-mesenchymal transition*

VEFG-fator de crescimento do endotélio vascular

$\alpha$ -SMA- alfa-actina do musculo

FAP - *Fibroblast activation protein alpha*

PDGFR- recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas

HAP-hidrocarbonetos policíclicos

NDMA-*N-nitrosodimethylamine*

NER- *Nucleotide excision repair*

TP53-proteína do tumor

SNPS-polimorfismos de nucleótido único

# Índice

Agradecimentos.....	3
Resumo.....	5
Abstract .....	6
Abreviaturas .....	7
1 Objetivo.....	13
2 Materiais e métodos .....	14
3 Carcinogénese .....	15
3.1 Definição e modelos .....	15
3.2 Hallmarks of cancer.....	17
3.3 Etapas da carcinogénese .....	18
3.3.1 Promoção.....	21
3.3.2 Progressão .....	22
3.4 Causas e Fatores de risco da carcinogénese .....	26
3.4.1 Predisposição genética .....	30
3.5 Mecanismos moleculares.....	31
3.6 Prevenção intervenção.....	33
3.7 Carcinogénese e Microambiente tumoral.....	33
4 Microambiente Tumoral.....	34
4.1 Introdução.....	34
4.2 Heterogeneidade celular .....	38
4.2.1 <i>Câncer associated fibroblasts</i> .....	38
4.2.2 Células imunitárias no microambiente tumoral .....	45
4.2.3 Células endoteliais.....	53
4.3 Componentes não celulares do Microambiente Tumoral .....	54
4.3.1 A matriz extracelular .....	54

4.3.2	Citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas .....	59
4.4	Hipóxia e reprogramação metabólica .....	65
4.5	Evasão imunitária e Imunoterapia .....	69
4.5.1	<i>Immune Checkpoints</i> .....	69
4.5.2	Linfócitos infiltradores de tumor.....	71
4.5.3	Impacto da Imunoterapia no microambiente tumoral e as suas consequências .	72
4.6	Interações estroma-tumor .....	72
4.7	<i>Cancer Stem cells</i> e o microambiente tumoral .....	73
4.8	Implicações e terapias dirigidas ao Microambiente tumoral .....	74
4.8.1	Terapias correntes e emergentes .....	74
4.8.2	Avanços tecnológicos e metodológicos .....	74
4.8.3	Implicações clínicas da medicina personalizada .....	75
4.8.4	Regulação epigenética do microambiente tumoral .....	76
4.8.5	Microbioma e o microambiente tumoral .....	77
4.8.6	Estudos comparativos através dos diferentes tipos de cancro.....	81
5	Conclusão .....	82
	Bibliografia.....	83

## Índice de Figuras e tabelas

Figura. 1 Complexidade dos processos de carcinogénese ilustrando as causas do cancro: radiação, químicos, vírus, bactérias .	15
Figura 2-Mecanismos de carcinogénese	16
Figura 3-Evolução tumoral por clones de células mutantes	17
Figura 4-Hallmarks of cancer	18
Figura 5-Carcinogénese por etapas	19
Figura 6-Mecanismos da carcinogénese	20
Figura 7-Fases da Carcinogénese	20
Figura 8- Modelo de carcinogénese por etapas no rato	22
Figura 9-Via de sinalização do RAS	23
Figura 10-Mutações nos modificadores epigenéticos do cancro	24
Figura 11-Papel da EMT na metastização	25
Figura 12-Fatores carcinogénicos intrínsecos e extrínsecos	26
Figura 13-A exposição humana a agentes químicos causadores de mutações no DNA	27
Figura 14-Sistema de reparação por NER	29
Figura 15-a TC-NER remove bloqueios de transcrição que impedem o funcionamento da RNA Pol II	30
Figura 16-Proporção de mutações específicas no gene TP53 em latinos	31
Figura 17-Vias de sinalização reguladas por genes	33
Figura 18-Os componentes celulares do TME e a sua complexidade	34
Figura 19-Artigo original de Paget 1889 e principais conclusões	35
Figura 20-Milestones in Tumor immunology	36
Figura 21-Crosstalk in TME	37
Figura 22-Células progenitoras dos CAFs	38
Figura 23-Subtipos de CAFs	39

Figura 24-Papel no CAFs nos processos imunológicos .....	41
Figura 25-Vias de sinalização dos CAFs .....	43
Figura 26-Mecanismo de regulação da morte celular mediadas por CAFs .....	44
Figura 27-Celulas imunitárias adaptativas .....	45
Figura 28-Linhagem mieloide .....	47
Figura 29-Células imunitárias da interface da imunidade inata e adaptativa .....	47
Figura 30-As citocinas e as vias de sinalização .....	48
Figura 31-Recrutamento e diferenciação dos TAM .....	49
Figura 32-Os subtipos de TAMs e a sua plasticidade funcional .....	50
Figura 33-TAMs são reguladores no TME .....	50
Figura 34-Mecanismo regulador do desenvolvimento dos timócitos .....	51
Figura 35-Papel funcional dos Th2 .....	52
Figura 36-Influencia da ECM nas Hallmarks of cancer .....	56
Figura 37-Influencia da ECM na cascada proliferativa .....	57
Figura 38-A ECM aberrante influência enúmeras doenças .....	58
Figura 39-As citocinas e a Imunorregulação .....	60
Figura 40-Interação celular- as Quimiocinas .....	61
Figura 41-Quimiocinas e metastização .....	62
Figura 42-Papel das exovesículas derivadas do tumor no TME .....	63
Figura 43-As exovesículas tumorais e o seu papel na metastização .....	64
Figura 44-Rede vascular nos tecidos normais versus tecidos tumorais .....	65
Figura 45-Hipóxia inibe a resposta imunitária no TME .....	66
Figura 46-Regulação do metabolismo da glucose sob condições de hipóxia .....	67
Figura 47-Efeito da hipóxia no metabolismo do TME- o papel do lactato .....	68
Figura 48-Mecanismos de evasão imunitária em microambientes de hipóxia.....	69
Figura 49-Recetores de Checkpoints e seus ligandos .....	70

Figura 50-Regulação epigenética .....	77
Figura 51-Funções da microbiota nos seus locais anatómicos.....	78
Figura 52-A Microbiota intratumoral pode facilitar a metastização .....	79
Figura 53-A interação entre a microbiota intestinal e o TME.....	79
Figura 54 A Microbiota intratumoral promove a progressão do tumor .....	80
Figura 55-Modulação da microbiota para fins terapêuticos .....	80

# **1 Objetivo**

Pretende-se, fazendo uma revisão bibliográfica, compreender as relações e os papéis de cada componente do Microambiente Tumoral (TME) na sua relação com a carcinogénese, com o intuito de identificar novas e possíveis estratégias de investigação e alvos terapêuticos que possam complementar, adequar ou inovar terapêuticas de intervenção que se revelem mais eficientes e adequadas ao tratamento e ao aumento da sobrevida dos doentes com cancro.

## 2 Materiais e métodos

Este trabalho, foi desenvolvido a partir da pesquisa na documentação científica disponível á data em diferentes bases de dados *PubMed*, *ScienceDirect* e *Elsevier*, *B-on*, *Google scholar*.

Os artigos selecionados foram publicados entre os anos 1971 e 2024.

Os termos de pesquisa mais utilizados foram carcinogénes; *tumoral microenvironment*, TME, Hallmarks of cancer, *cancer associated imune cells*

# 3 Carcinogénese

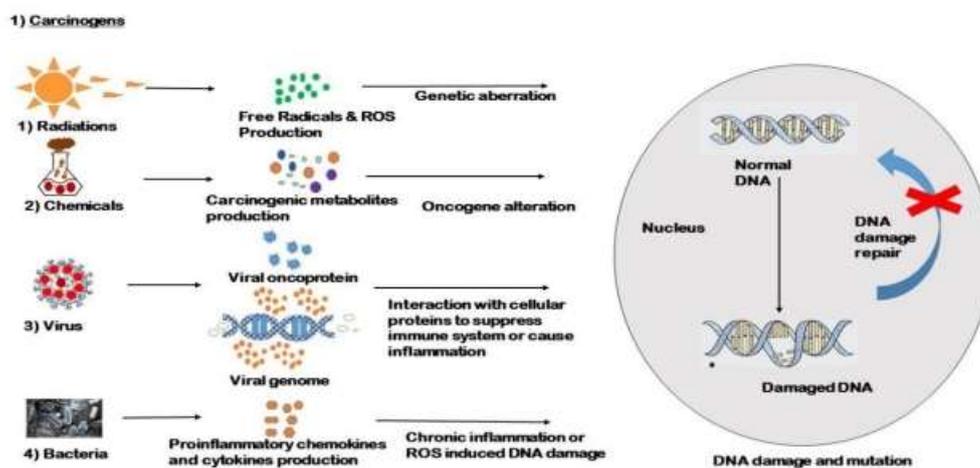
## 3.1 Definição e modelos

A Carcinogénese é o processo complexo e multifatorial pelo qual as células normais são transformadas em células cancerígenas (1–5)

A identificação clara das alterações genéticas e dos processos moleculares (1,6) envolvidos na transformação das células normais em tumorais, (Fig.1), permite o desenvolvimento de terapias específicas que inibam os processos de transformação, a melhoria dos tratamentos instituídos e dos efeitos adversos sentidos pelos doentes, e a identificação de biomarcadores para deteção precoce de tumores, o que é crítico na prevenção e sobrevivência dos doentes(7,8).

Estudos sobre fatores ambientais, como a exposição ao tabaco e à radiação definem a importância do desenho de estratégias de intervenção em saúde que sublinham a importância da mudança de estilos de vida.(4,5,9–11)

*Bhat et al.; Asian J. Res. Biochem., vol. 14, no. 4, pp. 111-125, 2024; Article no.AJRB.118556*



**Figura. 1** Complexidade dos processos de carcinogénese ilustrando as causas do cancro: radiação, químicos, vírus, bactérias (5).

As teorias subjacentes à carcinogénese têm por base vários modelos (12,13) onde se inclui o modelo por etapas (4,13–15), (Tabela 1).

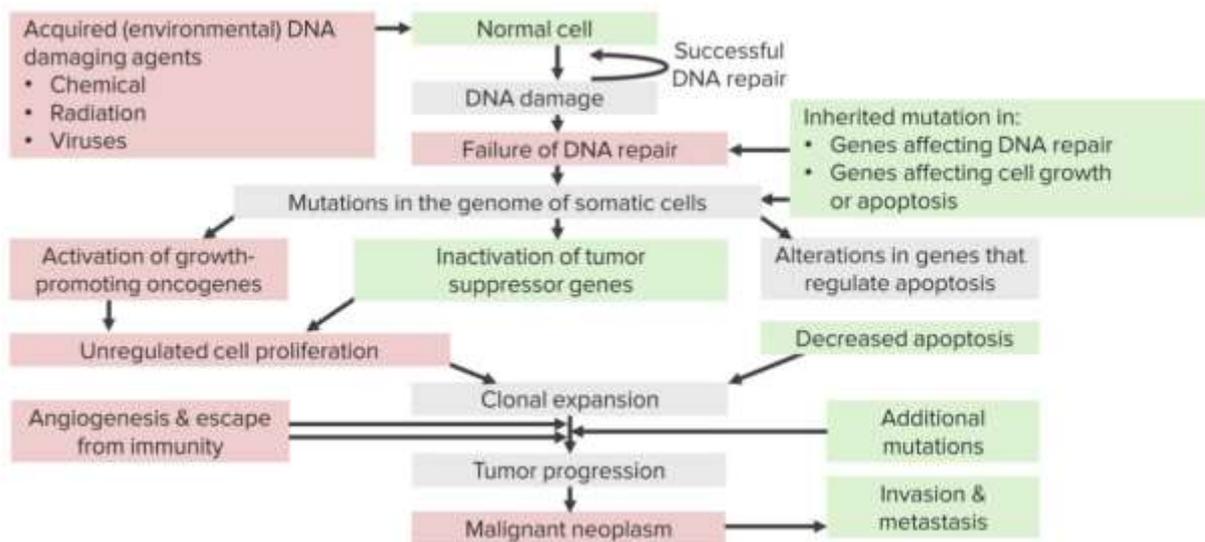
**Table 1.** Five recent non-exclusive models of carcinogenesis

	Model 1 'mutational'	Model 2 'genome instability'	Model 3 'non-genotoxic'	Model 4 'Darwinian'	Model 5 'tissue organization'
Main focus	Chemical carcinogens	Familiality Genome instability	Clonal expansion/epigenetics	Clonal expansion/cell selection	Microenvironment Morphostats
Examples	Viruses Tobacco and lung HPV	Colon cancer Rb	Diet, hormones	Beta-carotene, folate, chemotherapy	
Mechanisms	DNA adducts	CIN, MIN, MMR, Rb, BRCA1, TSG	Methylation histone acetylation	Selective advantage	
Mathematical models	Mutations Oncogenes Armitage-Doll	Knudson	Moolgavkar	Nowak	Baker

BRCA1, breast cancer 1 gene; HPV, human papillomavirus; MMR, mismatch repair; Rb, retinoblastoma.

**Tabela 1- Modelos de carcinogénese(13)**

O modelo mutacional ou por etapas teoriza que o processo da carcinogénese ocorre em etapas sequenciais e envolve um acumular sistemático e incremental de mutações, genéticas e epigenéticas ao longo do tempo(15–17),( Fig.2.)



**Figura 2-Mecanismos de carcinogénese**

<https://www.lecturio.com/author-stanley-oiseth/ Mechanisms of carcinogenesis due to carcinogens causing DNA damage>

Outros modelos como o modelo evolucionário, sugerem que a carcinogénese ocorre pela seleção natural de células mutantes, (Fig.3), em microambientes onde a competição por nutrientes vai determinar a sobrevivência dos clones com fenótipos que maximizam o *uptake* (amplificam os transportadores de membrana) ou a entrega de substrato (angiogénese)(13,17,18).

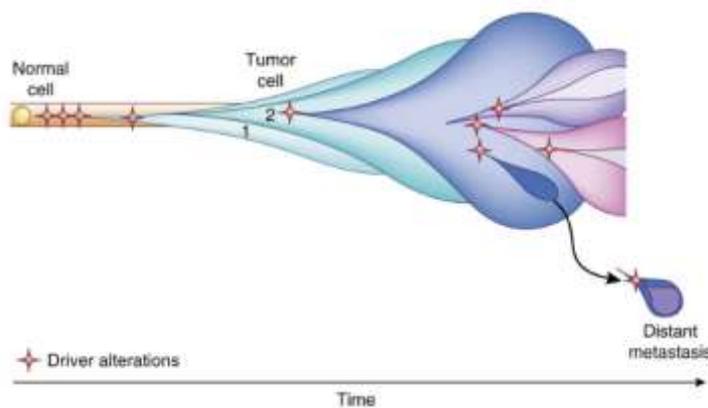


Figura 3-Evolução tumoral por clones de células mutantes (19)

### 3.2 Hallmarks of cancer

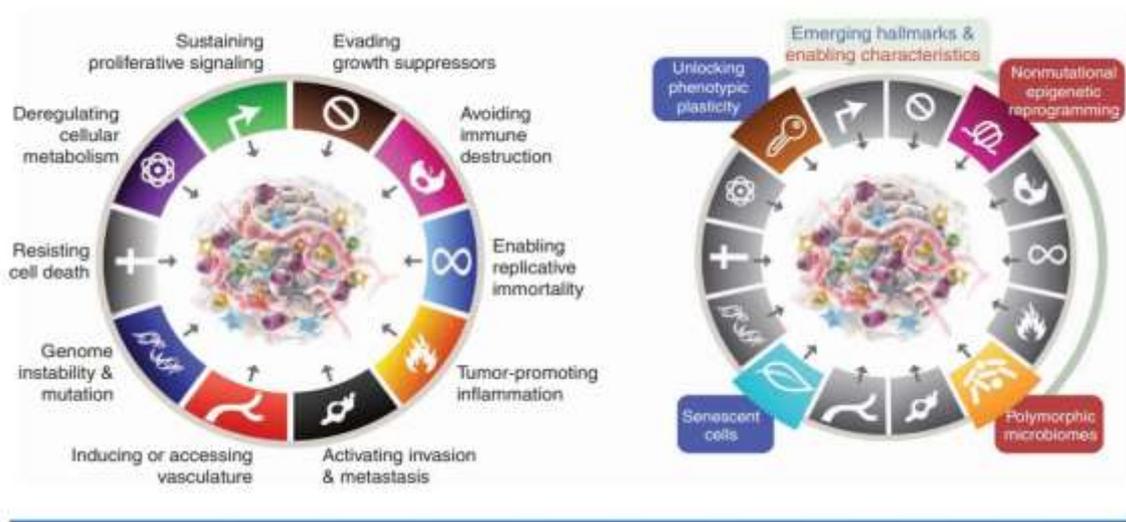
As células transformadas possuem características diferenciadoras da célula normal, i.e, aquisição de capacidades biológicas distintas, descritas por Hanahan,(2) e designadas por *Hallmarks of cancer*, que potenciam o crescimento incontrolável e a imortalidade (2,15,16,20)

Nestas características inclui-se a  **sinalização proliferativa sustentada**, independente de fatores externos- as células cancerígenas sinalizam continuamente para ao seu próprio crescimento, contornando os mecanismos de regulação do crescimento celular, (2)adquirem a capacidade de **evadir-se a mecanismos que normalmente limitam** o crescimento celular, com a perda de função do *gene supressor de Tumor (TP53)* (15); **resistem à morte celular programada - apoptose-** (15) e garantem a sobrevivência em condições hostis ao seu desenvolvimento (quando por exemplo quando estão sobre tratamento oncológico); **ativam a imortalidade replicativa-** a partir da regulação positiva da telomerase o que impede o encurtamento dos telómeros, inibe o envelhecimento e garante a divisão celular *ad aeternum*(2,15,16)

**Induzem a angiogénese**, estimulando a formação de novos vasos sanguíneos, nutrientes e oxigenadores das células neoformadas e da massa tumoral emergente (21) adquirem a capacidade de **se infiltrar, nos tecidos circundantes** e provocam **metástases-** migram para órgãos distantes do foco original do tumor (6).

Outras características como **a reprogramação do metabolismo energético celular**, i.e., o desvio da produção energética celular para a glicólise, mesmo na presença do oxigénio (efeito de Warburg)(15); e o desenvolvimento de **mecanismos de evasão** á detecção e eliminação pelo sistema imunitário evitando a sua destruição pelas células imunitárias efetivam a sua sobrevivência e progressão (15)

Novas características têm sido identificadas nas células tumorais tais como a **plasticidade acrescida**, que possibilita que transitem entre diferentes estados celulares contribuindo para a resistência terapêutica e a **reprogramação epigenética não mutacional**, as células cancerígenas aproveitam alterações epigenéticas como a metilação do DNA e a modificação das histonas para manterem os processos de transformação celular (16)



**Figura 4-Hallmarks of cancer (16)**

São características de ativação, a **instabilidade e mutação do genoma**- os tumores acumulam mutações genéticas que conduzem á progressão do cancro e à **inflamação crónica no microambiente tumoral**, (Fig.4,) ambas, **favorecem** o desenvolvimento do cancro e as metástases(16,22–25).

### 3.3 Etapas da carcinogénese

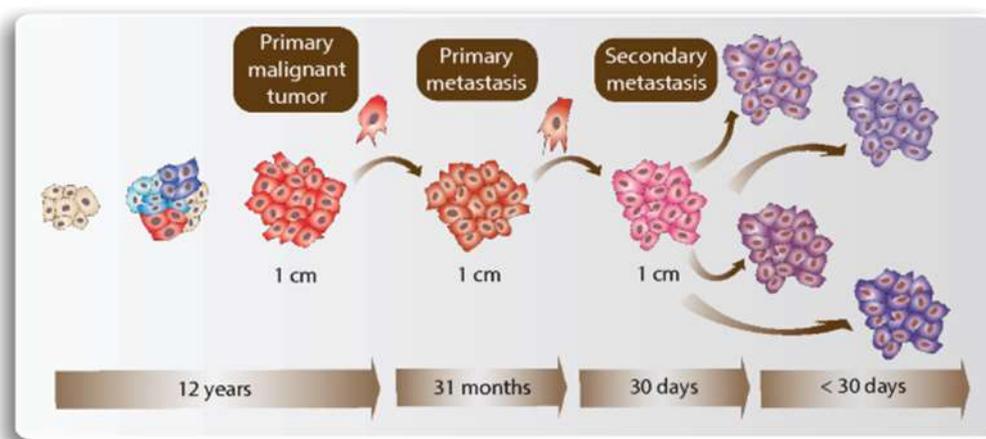
O desenvolvimento gradual, e complexo, que envolve o acumular de erros genéticos e epigenéticos, do processo de transformação das células normais em malignas, sugere que a carcinogénese progride por etapas e fases distintas: a **Iniciação**; a **promoção** e **progressão** (5,9,19).

Cada etapa envolve mutações específicas nos oncogenes e genes supressores de tumores, tabela 2, que permitem à célula transformada evadir-se aos mecanismos de controlo intracelulares normais do crescimento celular e adquirir propriedades invasivas.

Proto-oncogenes	Tumor-suppressor genes
Involved in cellular growth and differentiation	Function unknown but possibly involved in cellular growth and differentiation (negative regulators of cell growth?)
Family of genes exists	Family of genes exists
Activated (quantitatively or qualitatively) in cancers	Inactivated or lost in cancers
Activation by point mutation, chromosome translocation, or gene amplification	Inactivation by chromosome loss, chromosome deletion, point mutation, somatic recombination of gene conversion
Little evidence for involvement in hereditary cancers	Clear evidence for involvement in hereditary and nonhereditary cancers

**Tabela 2-Classes de genes envolvidos na carcinogénese (26)**

Este modelo-por etapas ou *multistep*, (Fig.5), é apoiado por dados experimentais e por observações clínicas e o cancro colorretal é frequentemente citado como exemplo clássico deste processo (6,27,28)

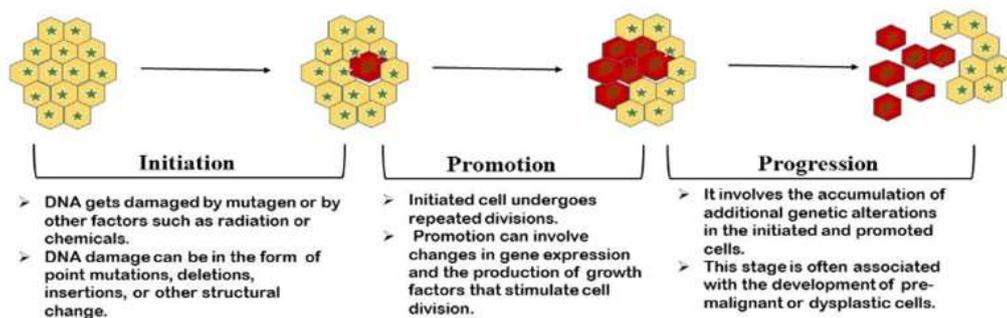


**Figura 5-Carcinogénese por etapas (25)**

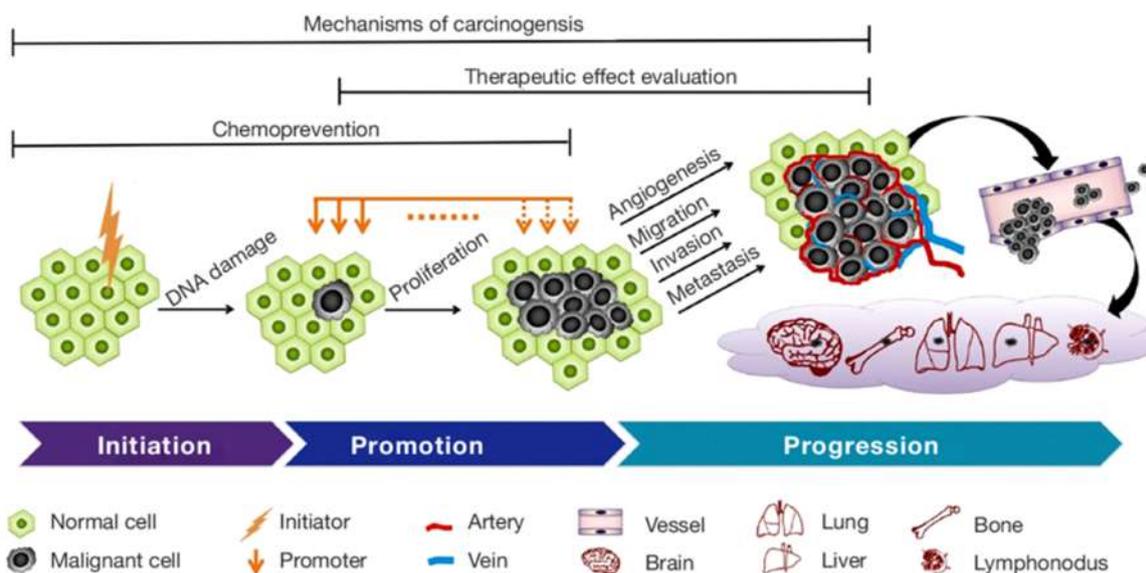
Avanços na sequenciação genética demonstram que lesões pré-cancerosas contêm mutações complexas, confirmando assim a natureza multietapas da carcinogénese (29).

Alterações em genes chave, permitem a expansão clonal, e mutações posteriores promovem a metástase e invasão a novos tecidos (14), (Fig.6).

A carcinogénese por etapas é influenciada por fatores ambientais e de estilo de vida, tais como a exposição a agentes carcinogénicos ou a fatores de dieta, fatores estes determinantes da progressão das células pré-neoplásicas (27,28,30–32).



**Figura 6-Mecanismos da carcinogénese (5)**



**Figura 7-Fases da Carcinogénese(33)**

### Iniciação

A iniciação envolve mutações genéticas irreversíveis no DNA celular causadas por agentes carcinogénicos aflatoxinas, poliacrilamidas, fumo do tabaco, radiação-raios UV e certos vírus. (9) ,( Fig. 7.) Estas mutações frequentemente afetam genes críticos como -proto oncogenes ou genes supressores de tumor,(12)que regulam a divisão e o crescimento celular (14).

Nesta fase as células transformadas proliferam descontroladamente formando tumores. Ocorrem mutações em oncogenes, tornando-os hiperativos, estimulando a divisão continua, enquanto mutações nos genes supressores de tumor, como o *TP53*, causam perda de controlo sobre o ciclo celular e a apoptose (6,28,31). Além disso, mutações em genes de reparação do DNA como o *BRCA1/2* comprometem a capacidade de correção de danos acelerando a carcinogénese(33), (Tabela 2).

A instabilidade genómica impulsionada por mutações em genes como *MYC* e *RAS* resulta em acumulações adicionais de mutações que favorecem a progressão tumoral(15)

Nesta fase inicial, a transformação celular ainda é reversível e fenotipicamente as células aparentam normalidade(12).(Fig.6 e 7, Tabela 3).

Initiation	Promotion	Progression
Irreversible with constant "stem cell" potential Initiated "stem cell" not morphologically identifiable	Operationally reversible both at the level of gene expression and at the cell level by "remodeling" and/or apoptosis	Irreversible Measurable or morphologically discernible alteration in cell genome's structure
Efficacy sensitive to xenobiotic and other chemical factors	Promoted cell population existence dependent on continued administration of the promoting agent	
Spontaneous (fortuitous) occurrence of initiated cells can be quantitated	Efficacy sensitive to aging and dietary and hormonal factors	Growth of altered cells sensitive to environmental factors during early phase of this stage
Requires cell division for "fixation" Dose-response does not exhibit a readily measurable threshold	Dose-response exhibits measurable threshold and maximal effect dependent on dose of initiating agent	Benign or malignant neoplasms characteristically seen
Relative effect of initiators depends on quantitation of focal lesions following defined period of promotion	Relative effectiveness of promoters is measured by their effectiveness when given at a constant dose rate to cause an expansion of the progeny of the initiated cell population	"Progressor" agents act to advance promoted cells into this stage but may not be initiating agents

\* Adapted.<sup>34</sup>

**Tabela 3- Características morfológicas das etapas do cancro** (34)

### 3.3.1 Promoção

As células transformadas são induzidas à proliferação celular por meio de estímulos externos, como fatores hormonais, inflamação crónica, ou promotores químicos. É uma fase reversível, que ocorre sem alterações genéticas adicionais, mas sim por modificações epigénicas que promovem a expansão clonal das células mutadas. (10,31). A inflamação cria um ambiente crónico pró-cancerígeno ao libertar citocinas e espécies reativas de oxigénio que favorecem a sobrevivência e a proliferação celular além de induzir mais danos ao DNA (35,36).

Hormonas como os estrogénios no cancro da mama e os androgénios no cancro da próstata, desempenham um papel central ao estimular o crescimento de células, incluindo as transformadas, conferindo-lhes uma vantagem seletiva na progressão tumoral. Estes promotores modulam vias de sinalização como por exemplo, NF-KB, PI3K-AkT, que superam os mecanismos reguladores normais, ampliando a expansão clonal das células mutadas e garantindo vantagem seletiva das células tumorais sobre as células normais (37,38)

Condições como a endometriose, exemplificam a interação entre o estrogénio e a inflamação, com o hormônio, a promover a libertação de mediadores pro-inflamatórios que inibem a apoptose e incentivam à proliferação e adesão celular. Esta dinâmica sustenta a sobrevivência

das células transformadas, apoia processos como a angiogénese e a neurogénese, essenciais para o crescimento contínuo e a disseminação das células tumorais (39)

No caso da inflamação alérgica, estudos em murinos demonstraram mostram que o estrogénio tem efeitos pró e anti-inflamatórios influenciando tanto a proliferação celular quanto a resposta imune. A remoção do estrogénio (por exemplo, via ovariectomia), reduz os marcadores inflamatórios como os eosinófilos e a IL-5, frequentemente elevados em respostas alérgicas que contribuem para o crescimento celular anormal (40)

### 3.3.2 Progressão

A progressão envolve outras alterações nas células transformadas devido a fatores como o aumento da instabilidade genómica(41), influências ambientais e pressões seletivas que contribuem para as características malignas dos tumores invasivos. Esta é caracterizada por invasão a tecidos adjacentes, angiogénese e metástase(2,15) (Fig.8)

Durante a progressão, as células sofrem mutações adicionais em genes reguladores chave como oncogenes, por exemplo *KRAS*, *MYC*, (42) ,(Fig.9), e em genes supressores de tumores, por exemplo *TP53*, *RB*, que controlam o ciclo celular e a apoptose(28,43).

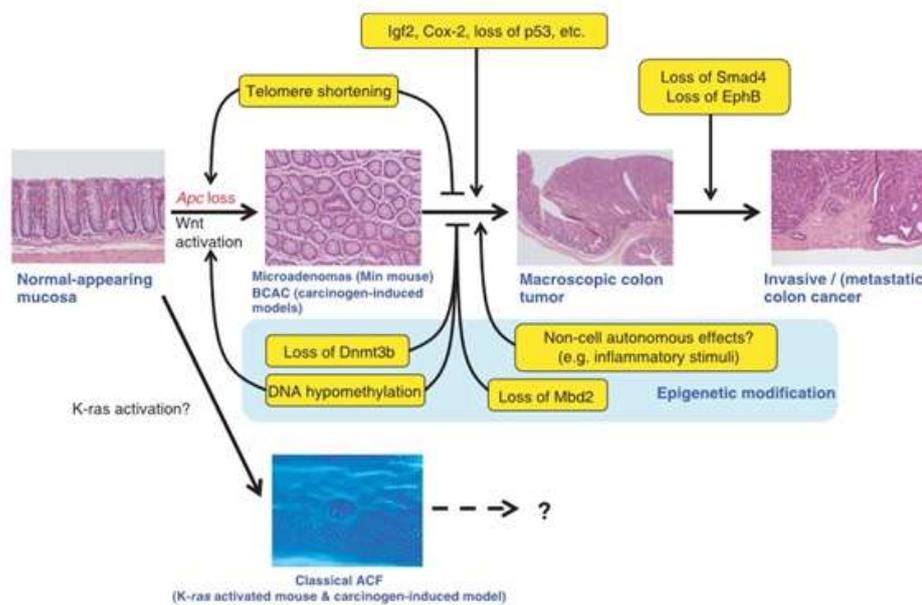
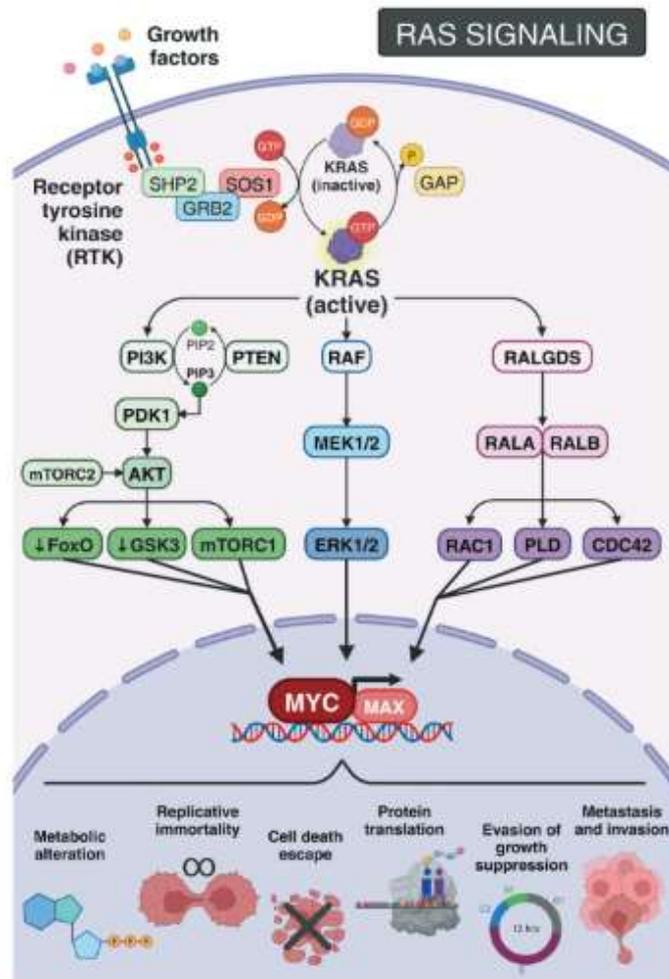


Fig. 2. A model for multistage colon carcinogenesis in mice and its possible modifiers. Genetically engineered mice have shown a number of modifiers for different stages of colon carcinogenesis.

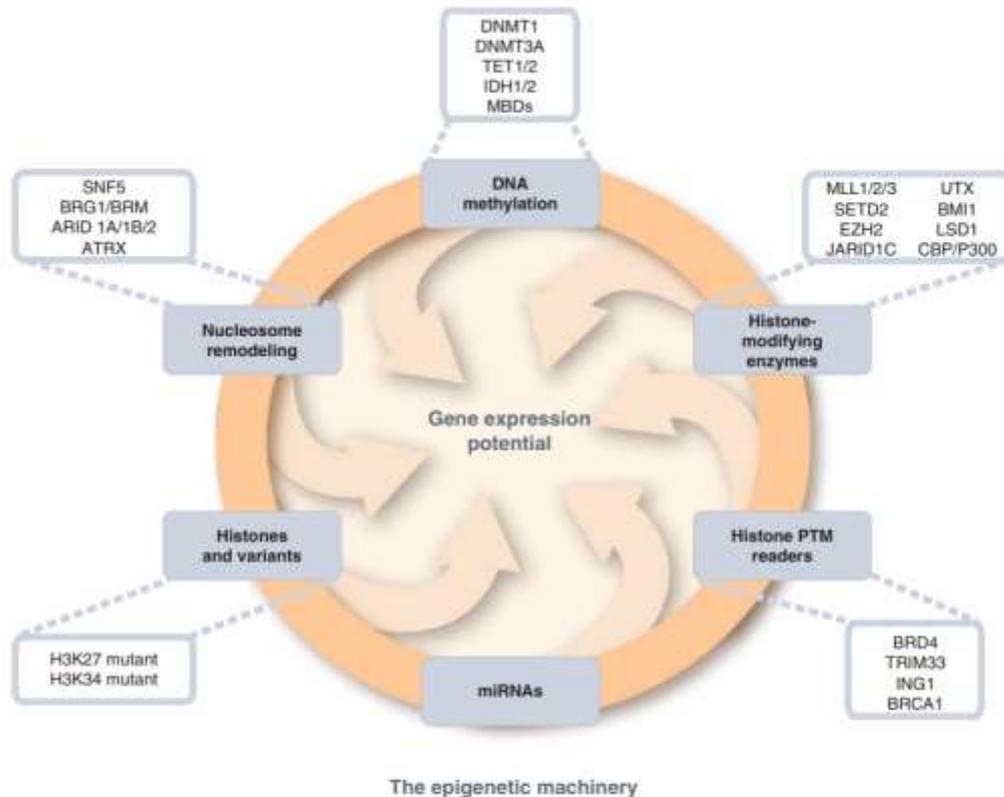
Figura 8- Modelo de carcinogénese por etapas no rato(29)



**Fig. 1** RAS signaling pathway. Various soluble growth factors activate receptor tyrosine kinases (RTK) on the surface of tumor cells. The recruitment of several proteins, such as Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2 (SHP2) and growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), can initiate the recruitment of a guanine nucleotide exchange factor, like Son of Sevenless 1 (SOS1), facilitating the conversion of KRAS from its inactive GDP-bound state to an active GTP-bound state. This dynamic is reversible through the engagement of GTPase-activating proteins (GAPs). The three most prevalent KRAS-activated pathways are: 1. PI3K/PDK1/AKT pathway, in which PI3K phosphorylates PIP2 to PIP3, attracting PDK1 that, together with mTORC2, activates AKT, regulating FoxO family, GSK3 and mTORC1; 2. RAF/MEK1/2/ERK1/2 pathway; and 3. RALGDS/RALA/RALB pathway, which activates the effectors RAC1, CDC42 and PLD. All these pathways culminate in the activation of MYC target genes, propelling key cancer hallmarks such as metabolic reprogramming, replicative immortality, cell death escape, protein translation, resistance to growth suppression, metastasis and invasion. Created with BioRender.com

### Figura 9-Via de sinalização do RAS (42)

Estas mutações conduzem a um aumento da proliferação celular, redução da morte celular, instabilidade genómica e resistência a sinais inibidores do crescimento. As alterações epigenéticas, (Fig. 10), como a metilação do DNA e a modificação das histonas, contribuem para a malignidade ao silenciarem os genes supressores de tumores e ao alterarem a expressão genética(44,45).

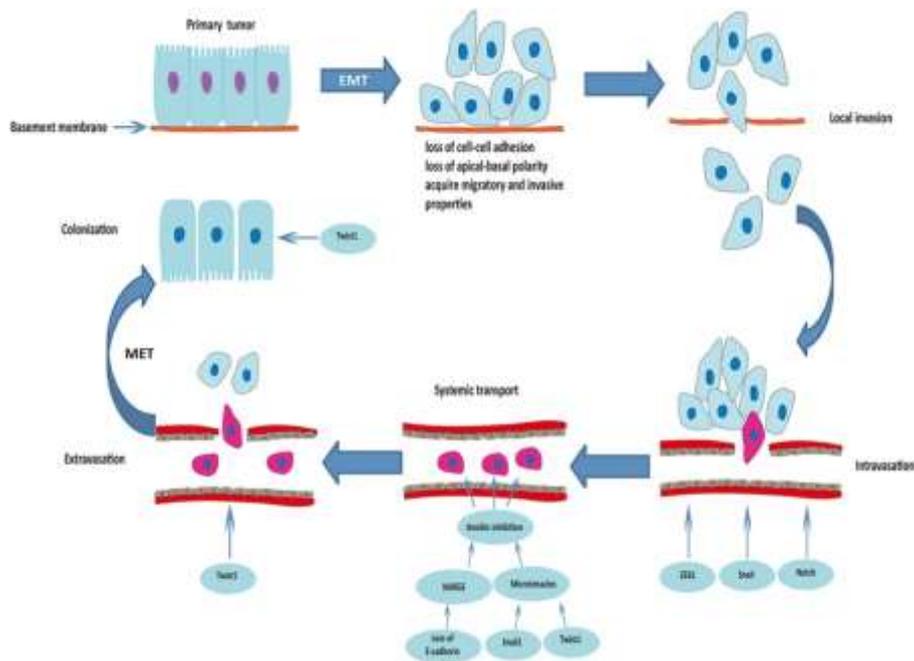


**Figure 1.** Genetic mutations of epigenetic modifiers in cancer. The drawing shows the input of epigenetic processes in specifying gene expression patterns. Recent whole-exome sequencing studies show that mutations in various classes of epigenetic modifiers are frequently observed in many types of cancers, further highlighting the cross talk between genetics and epigenetics. Examples of some, but not all, of these mutations are illustrated here and listed in Table 2. The mutations of epigenetic modifiers potentially cause genome-wide epigenetic alterations in cancer, but, save for isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations as discussed in the text, these have yet to be shown on a genome-wide scale. Understanding the relationship of genetic and epigenetic changes in cancer will offer novel insights for cancer therapies. MBDs, methylcytosine-binding proteins; PTM, posttranslational modification. (Adapted from You and Jones 2012.)

### Figura 10-Mutações nos modificadores epigenéticos do cancro (44)

A medida que a progressão continua, as células transformadas adquirem características definidas por Hannahan e Weinberg como *Hallmarks of cancer*(15), que incluem a manutenção da sinalização proliferativa, a evasão ao supressores de crescimento, a imortalidade replicativa e a ativação da invasão e das metástases.(2,15,16,46) As células tumorais desenvolvem ainda um potencial angiogénico (21,47), adquirindo a capacidade de induzir a formação de vasos sanguíneos para sustentar o seu crescimento.

A transição epitelial para mesenquimal (EMT) é um evento fundamental na invasão do cancro, em que as células epiteliais perdem as suas propriedades de adesão e adquirem características mesenquimatosas(48), aumentando o seu potencial migratório e invasivo, (Fig.11).



**Figura 11-Papel da EMT na metastatização (48)**

A metastatização envolve a disseminaçaõ a partir do tumor primário, destas células, a sobrevivência em circulaçaõ e a colonizaçaõ de tecidos distantes(49,50). A investigaçaõ recente, destaca o papel do microambiente tumoral (TME), das células estromais, das células imunitárias e dos componentes da matriz extracelular na facilitaçaõ da transiçaõ para o cancro invasivo e metastático (51)

A interaçãõ tumor, sistema imunitário é outro ponto critico desta etapa, as células cancerígenas escapam á vigilância imunitária através de mecanismos de regulaçaõ positiva(52–55).

O aumento das mutaçaõs genéticas leva a uma maior proliferaçaõ celular, resistênciã à morte celular e invasãõ dos tecidos confinantes. Este processo degrada a matriz extracelular através de enzimas como as metaloproteínases (MMPS) e altera as moléculas de adesãõ como as integrinas, permitindo que as células tumorais migrem, invadam os tecidos circundantes e se espalhem para órgãõs distantes- metástases(56–58).

Outros fatores do TME, como a hipóxia e a inflamaçaõ promovem a angiogênese e facilitam a metastatizaçaõ.

### 3.4 Causas e Fatores de risco da carcinogénese

O desenvolvimento do cancro resulta de fatores de risco intrínsecos, como predisposições genéticas, imunocompetência, idade e influencia hormonais e extrínsecos, associados ao ambiente(59–62), (Fig.12).

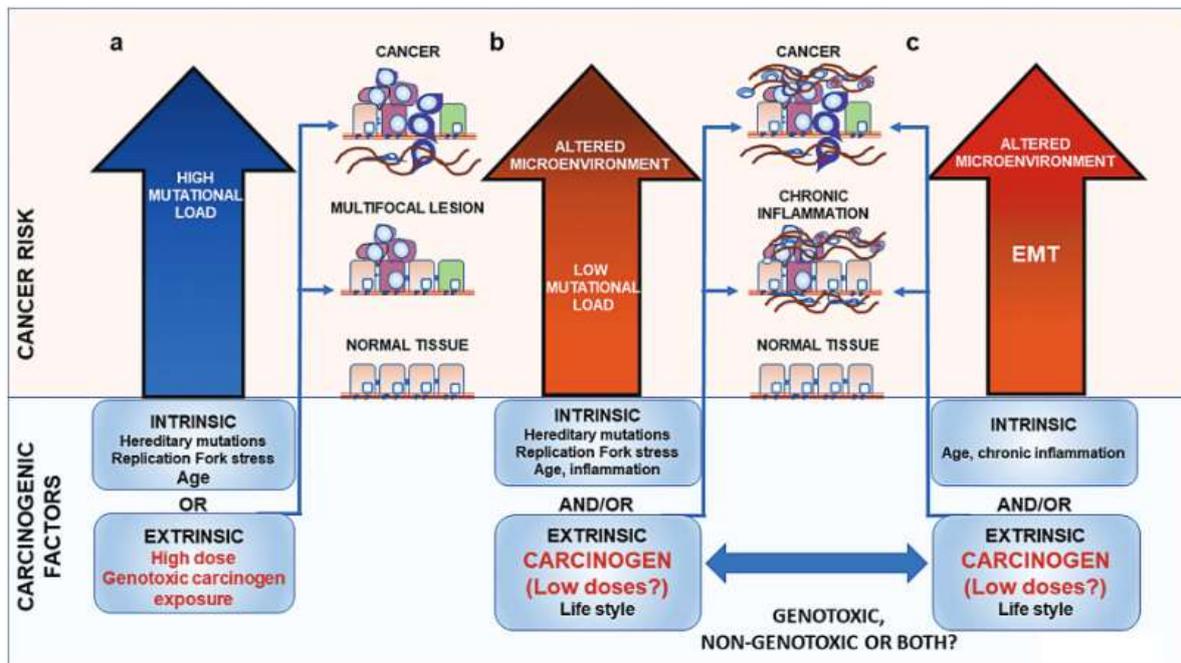


Figure 1. Different models connecting cancer risk with causative factors. (a) The classical model connects the mutational load with cancer initiation and progression. A high dose of genotoxic carcinogen's exposure (extrinsic factor) correlates with increased cancer risk through a mutagenic mechanism shutting driver genes and thus eliciting neoplastic transformation. Mutations can also arise from both intrinsic factors, i.e. replication fork stress, inflammation, or lifestyle. (b) The updated model proposes that a microenvironment altered by either intrinsic or extrinsic factors acts as a sound box for the transformation process. Altered signaling from microenvironment (secreted cytokines by immune cells or mechano-transduction signals) would integrate the biological effect of few genomic lesions or promote selection for adaptive pro-neoplastic mutations; chemicals may actively contribute to changes in cell homeostasis both by fueling inflammation and/or affecting DNA integrity. (c) A proposed model linking altered milieu and cancer development. A prolonged inflammation induces inflammatory cell infiltration with massive collagen deposition causing matrix stiffness. These changes in the microenvironment could be enough to trigger epithelial mesenchymal transition and to rewire the gene expression profile toward malignancy even in the absence of genomic lesions. The carcinogen may contribute to this process even at low doses, beyond the mere induction of genetic alterations.

Figura 12-Fatores carcinogénicos intrínsecos e extrínsecos (60)

Cerca de 70% dos casos de cancro decorrem da carcinogénese química, causada por poluentes industriais, tabagismo e aflatoxinas que causam danos ao DNA(63),( Fig.13, Tabela 4).

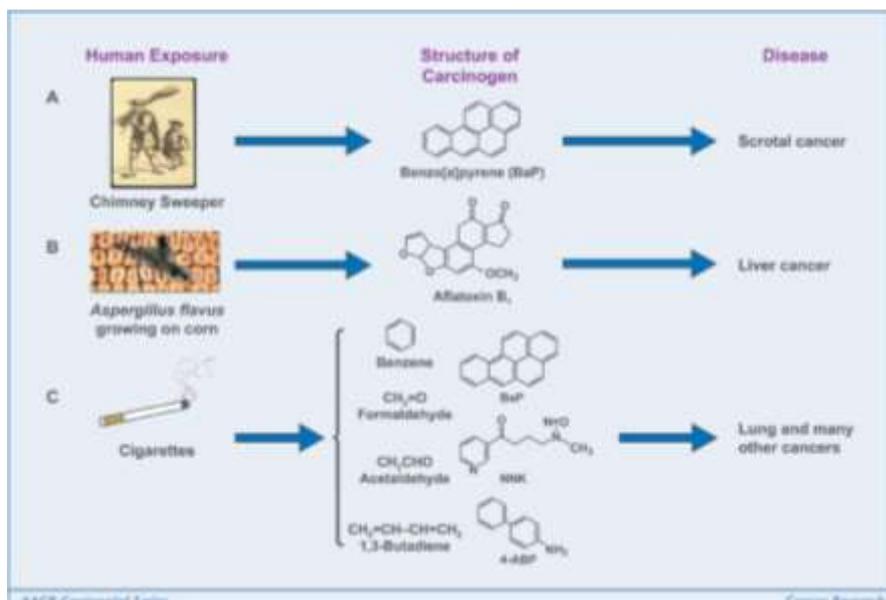


Figura 13-A exposição humana a agentes químicos causadores de mutações no DNA (4)

Além disso, dieta, estilo de vida, álcool e exposição a metais pesados aumentam o risco de carcinogênese, especialmente em exposições prolongadas, (Tabela.4.)

Carcinogenic Chemicals	Target Tissue	Potential Mode of Action	Associated Agent/Substance
Formaldehyde	Nasal Cavity	Induces DNA damage, promotes nasal cancer	Occupational exposure (e.g., certain industries)
Benzene	Bone Marrow, Blood	Disrupts hematopoiesis, promotes leukemia	Occupational exposure (e.g., petrochemical industry)
Arsenic	Skin, Lung, Bladder	Promotes oxidative stress, disrupts DNA repair	Contaminated drinking water, certain industrial exposures
Vinyl Chloride	Liver, Lungs	Metabolites cause DNA damage and protein dysfunction	Occupational exposure (e.g., plastics manufacturing)
Chromium (VI)	Lung, Nasal Cavity	Generates ROS, DNA damage	Occupational exposure (e.g., in metalworking)
Nickel Compounds	Lung, Nasal Cavity	Impair DNA repair, cause oxidative stress	Occupational exposure (e.g., nickel refining)
1,3-Butadiene	Blood, Lymphatic	Forms DNA adducts, disrupts cell cycle control	Occupational exposure (e.g., rubber production)
Acrylamide	Nervous System, Liver	Forms DNA adducts, induces mutations in nerve cells	Present in certain foods cooked at high temperatures
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	Various Tissues	Activate carcinogen-metabolizing enzymes, DNA damage	Found in tobacco smoke, air pollution, and grilled meat

Tabela 4- Carcinogêneos químicos (64)

Os carcinogêneos químicos, como hidrocarbonetos policíclicos (HAP) podem formar ligações covalentes com nucleótidos do DNA, distorcendo a sua estrutura e gerando erros de replicação, além de induzirem stress oxidativo(65,66).

A alquilação do DNA é um mecanismo importante de mutação, em que compostos como o benzo[a]pireno formam aductos com a guanina levando a mutações com a troca de guanina por adenina(67–69).

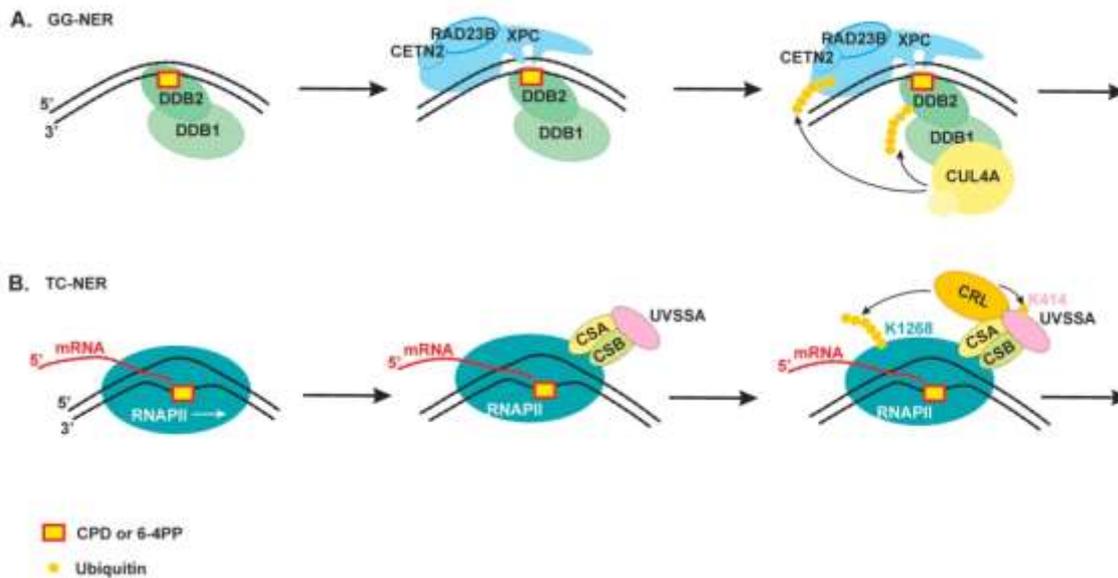
A N-nitrosodimetilamina (NDMA), por sua vez cria O-6-metilguanina, o que perturba o emparelhamento de bases e induz mutações associadas a vários câncros (68,69), (Tabela 5).

**Table 1.** Important nitrosamines, formed DNA alkylation adducts, and their sources.

Nitrosamines	Abbreviation	Major DNA Alkylation Adducts	Sources
<i>N</i> -nitrosodimethylamine	NDMA	N7-MeG, N3-MeA, O <sup>6</sup> -MeG, O <sup>2</sup> -MeT, O <sup>4</sup> -MeT	Food, drugs, tobacco smoke
<i>N</i> -nitrosodiethylamine	NDEA	N7-EtG, N3-EtA, O <sup>6</sup> -EtG, O <sup>2</sup> -EtT, O <sup>4</sup> -EtT	Food, drugs
<i>N</i> -nitrosopiperidine	NPIP	7-(2-oxopropyl)-N1,N <sup>2</sup> -etheno-G, N <sup>2</sup> -(3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-2'-G	Food
<i>N</i> -nitrosopyrrolidine	NPYR	N7,8-ButanoG, N7-(4-Oxobutyl)-G, O <sup>4</sup> -(4-OH-Butyl)-T, and others	Food
<i>N</i> -nitrosodiethanolamine	NDELA	O <sup>6</sup> -OHEtG and others; glyoxal adducts	Cosmetics
<i>N</i> -nitroso- <i>N</i> -methyl-4-aminobutanoic acid	NMBA	unknown	Drugs
<i>N</i> -nitrosodiisopropylamine	NDIPA	unknown	Drugs
<i>N</i> -nitrosoethylisopropylamine	NEIPA	unknown	Drugs
<i>N</i> -nitrosomethylphenylamine	NMPA	unknown	Drugs
<i>N</i> -nitrosoarenicline	-	unknown	Drugs
<i>N</i> -nitrosoalbutamol	-	unknown	Drugs
4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; (nicotine-derived nitrosamine ketone)	NNK	N7-MeG, N3-MeA, N3-MeG, O <sup>6</sup> -MeG, O <sup>4</sup> -MeG, O <sup>6</sup> -pobG	Tobacco smoke
4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; (nicotine-derived nitrosamine alcohol)	NNAL	N7-MeG, N3-MeA, N3-MeG, O <sup>6</sup> -MeG, O <sup>4</sup> -MeG, O <sup>6</sup> -pobG	Tobacco smoke
<i>N'</i> -nitrosornicotine	NNN	O <sup>6</sup> -pobG	Tobacco smoke
<i>N'</i> -nitrosoanabasine	NAB	unknown	Tobacco smoke
<i>N'</i> -nitrosoanatabine	NAT	unknown	Tobacco smoke

### Tabela 5-Nitrosaminas que formam aductos no DNA(64)

Deficiências nos sistemas de reparação celular, particularmente na via de reparação por excisão de nucleótidos (NER), dificultam a remoção de aductos volumosos e promovem a acumulação de erros genéticos(70,71) , (Fig.14).



**Figure 2.** An overview of the damage recognition step of nucleotide excision repair (NER). (A) Global genome NER (GG-NER) can search for damage anywhere in the genome throughout the cell cycle. The UV-DDB protein recognizes CPD or 6-4PP, directly binds to it through its DDB2 subunit, and facilitates efficient recognition of the lesion by the XPC–RAD23B–CETN2 complex. The DDB1 subunit is also a connector protein for ubiquitin ligase CUL4, which ubiquitinates DDB2 and XPC [33]. (B) Transcription-coupled NER (TC-NER) is responsible for accelerated repair of lesions in the template DNA strand of actively transcribed genes only. The CSB protein and then proteins CSA and UVSSA bind to DNA damage stalled RNAPII. CSA and CSB associate with CRL ubiquitin ligase and contribute to the ubiquitination of the RNAPII RPB1 subunit at K1268. This ubiquitination stimulates the association of TFIIH with the stalled RNAPII through a transfer mechanism that also involves UVSSA-K414 ubiquitination [9,35].

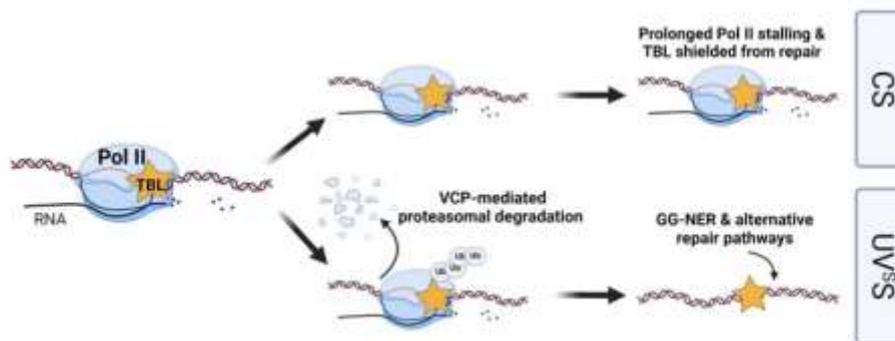
### Figura 14-Sistema de reparação por NER(71)

A NER acoplada à transcrição (TC-NER), (Fig.15), é fundamental na remoção eficiente de aductos em genes transcritos, sendo a RNA polimerase II essencial para o reconhecimento e início da reparação(72,73).

## Abstract

DNA damage severely impedes gene transcription by RNA polymerase II (Pol II), causing cellular dysfunction. Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair (TC-NER) specifically removes such transcription-blocking damage. TC-NER initiation relies on the CSB, CSA and UVSSA proteins; loss of any results in complete TC-NER deficiency. Strikingly, UVSSA deficiency results in UV-Sensitive Syndrome (UV<sup>S</sup>S), with mild cutaneous symptoms, while loss of CSA or CSB activity results in the severe Cockayne Syndrome (CS), characterized by neurodegeneration and premature aging. Thus far the underlying mechanism for these contrasting phenotypes remains unclear. Live-cell imaging approaches reveal that in TC-NER proficient cells, lesion-stalled Pol II is swiftly resolved, while in CSA and CSB knockout (KO) cells, elongating Pol II remains damage-bound, likely obstructing other DNA transacting processes and shielding the damage from alternative repair pathways. In contrast, in UVSSA KO cells, Pol II is cleared from the damage via VCP-mediated proteasomal degradation which is fully dependent on the CRL4<sup>CSA</sup> ubiquitin ligase activity. This Pol II degradation might provide access for alternative repair mechanisms, such as GG-NER, to remove the damage. Collectively, our data indicate that the inability to clear lesion-stalled Pol II from the chromatin, rather than TC-NER deficiency, causes the severe phenotypes observed in CS.

## Graphical abstract



**Figura 15-a TC-NER remove bloqueios de transcrição que impedem o funcionamento da RNA Pol II(71)**

Além disso, a metabolização de carcinógenos gera intermediários reativos que intensificam danos ao DNA e contribuem para a carcinogênese(74–76).

### 3.4.1 Predisposição genética

A predisposição genética para o cancro envolve mutações em genes supressores de tumor, como TP53 e o BRCA1/2 (28,77,78), fundamentais para a regulação do ciclo celular e para a reparação do DNA. Mutações nos genes BRCA1/2 por exemplo, aumentam o risco de sarcoma induzido por radiação após terapia oncológica, devido ao seu papel nos mecanismos de reparação do DNA(79–82). Indivíduos com mutações no haplótipo TP53 r337h também apresentam maior risco de cancro ao interagirem com exposição à radiação (83)

Polimorfismos de nucleótido único (SNPS) e outras variantes genéticas influenciam a suscetibilidade ao cancro; variantes em genes como o *MRPS30-DT* e *NNJ* afetam o risco de cancro do pulmão, com alguns genótipos modulando esse risco em combinação com fatores como o tabagismo e consumo de álcool (83–90).

A ascendência genética também impacta: mutações EFGR no cancro do pulmão são mais comuns em indivíduos com ascendência africana, enquanto mutações no gene *TP53* prevalecem mais em latinos(86,91–94), ( Fig.16).

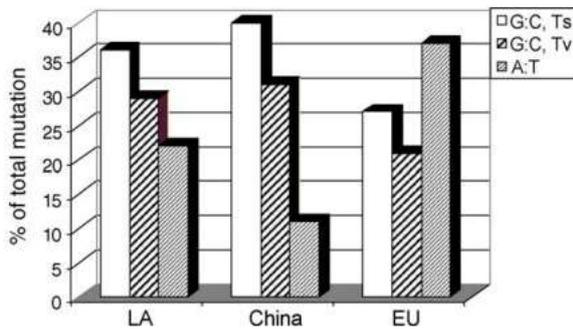


Fig. 5. Proportion of specific types of *TP53* mutations in esophageal squamous cell carcinoma from Latin America (LA), and high incidence areas in China and Europe (EU). Mutation data from LA were selected from the R8 release of the IARC *TP53* database (June 2003). Figures for China and EU were taken from [84]. The total number of mutations in primary tumors are 54 for LA, 314 for China and 144 for EU.

### Figura 16-Proporção de mutações específicas no gene TP53 em latinos(95)

No cancro colorretal, pontuações de risco poligénico (PRS) calculadas a partir de estudos de associação genómica ampla (GWAS), são utilizadas como biomarcadores clínicos preditivos, ajudando a estratificar o risco genético e permitindo intervenções personalizadas e deteção precoce(95–97)

### 3.5 Mecanismos moleculares

As mutações em proto oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparação do DNA, colaboram na carcinogénese caracterizada pela instabilidade genómica, um aspeto distinto do cancro. Esta instabilidade, manifestada por uma elevada taxa de mutações e aberrações cromossómicas, resulta diretamente das mutações destes genes, Tabela 6,(31,41,98–100).

Proto oncogenes codificam proteínas que controlam o crescimento e a divisão celular; quando mutados, transformam-se em oncogenes, promovendo uma proliferação celular descontrolada. Mutações em genes da família RAS, por exemplo, podem ativar de forma continua vias de sinalização de crescimento, favorecendo a transformação maligna das células (43,101–107)

Genes supressores de tumor, como *TP53* e *RBI*, regulam a divisão celular e induzem a apoptose. Mutações ou perda de função nesses genes eliminam pontos de controlo cruciais, permitindo que células transformadas proliferem sem restrição (28,31,108)

Os genes de reparação do DNA, incluindo aqueles envolvidos na correção de erros de replicação (como *MLHA* e *MSH*”), mantém a estabilidade genómica. Defeitos nesses

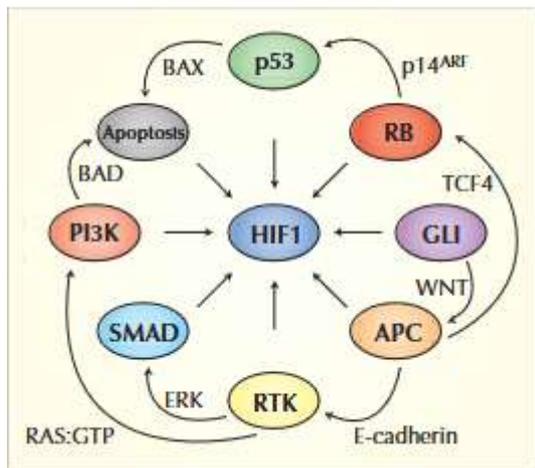
mecanismos de reparação levam à acumulação de mutações, intensificando a instabilidade genómica e acelerando a progressão do cancro (4,15,109–113)

Gene (synonym(s)) <sup>a</sup>	Syndrome	Hereditary pattern	Second hit	Pathway <sup>b</sup>	Major heredity tumor types <sup>c</sup>
<b>Tumor-suppressor genes</b>					
<i>APC</i>	FAP	Dominant	Inactivation of WT allele	APC	Colon, thyroid, stomach, intestine
<i>AXIN2</i>	Attenuated polyposis	Dominant	Inactivation of WT allele	APC	Colon
<i>CDH1</i> (E-cadherin)	Familial gastric carcinoma	Dominant	Inactivation of WT allele	APC	Stomach
<i>GPC3</i>	Simpson-Golabi-Behmel syndrome	X linked	?	APC	Embryonal
<i>CYLD</i>	Familial cylindromatosis	Dominant	Inactivation of WT allele	APOP	Piloerichomas
<i>EXT1,2</i>	Hereditary multiple exostoses	Dominant	Inactivation of WT allele	GLI	Bone
<i>PTCH</i>	Gorlin syndrome	Dominant	Inactivation of WT allele	GLI	Skin, medulloblastoma
<i>SUFU</i>	Medulloblastoma predisposition	Dominant	Inactivation of WT allele	GLI	Skin, medulloblastoma
<i>FH</i>	Hereditary leiomyomatosis	Dominant	Inactivation of WT allele	HIF1	Leiomyomas
<i>SDHB, C, D</i>	Familial paraganglioma	Dominant	Inactivation of WT allele	HIF1	Paragangliomas, pheochromocytomas
<i>VHL</i>	Von Hippel-Lindau syndrome	Dominant	Inactivation of WT allele	HIF1	Kidney
<i>TP53 (p53)</i>	Li-Fraumeni syndrome	Dominant	Inactivation of WT allele	p53	Breast, sarcoma, adrenal, brain...
<i>WT1</i>	Familial Wilms tumor	Dominant	Inactivation of WT allele	p53	Wilms'
<i>STK11 (LKB1)</i>	Peutz-Jeghers syndrome	Dominant	Inactivation of WT allele	PI3K	Intestinal, ovarian, pancreatic
<i>PTEN</i>	Cowden syndrome	Dominant	Inactivation of WT allele	PI3K	Hamartoma, glioma, uterus
<i>TSC1, TSC2</i>	Tuberous sclerosis	Dominant	Inactivation of WT allele	PI3K	Hamartoma, kidney
<i>CDKN2A (p16<sup>INK4A</sup>, p14<sup>ARF</sup>)</i>	Familial malignant melanoma	Dominant	Inactivation of WT allele	RB	Melanoma, pancreas
<i>CDK4</i>	Familial malignant melanoma	Dominant	?	RB	Melanoma
<i>RB1</i>	Hereditary retinoblastoma	Dominant	Inactivation of WT allele	RB	Eye
<i>NF1</i>	Neurofibromatosis type 1	Dominant	Inactivation of WT allele	RTK	Neurofibroma
<i>BMPRI1A</i>	Juvenile polyposis	Dominant	Inactivation of WT allele	SMAD	Gastrointestinal
<i>MEN1</i>	Multiple endocrine neoplasia type 1	Dominant	Inactivation of WT allele	SMAD	Parathyroid, pituitary, islet cell, carcinoid
<i>SMAD4 (DPC4)</i>	Juvenile polyposis	Dominant	Inactivation of WT allele	SMAD	Gastrointestinal
<i>BHD</i>	Birt-Hogg-Dube syndrome	Dominant	Inactivation of WT allele	?	Renal, hair follicle
<i>HRPT2</i>	Hyperparathyroidism Jaw-tumor syndrome.	Dominant	Inactivation of WT allele	?	Parathyroid, jaw fibroma
<i>NF2</i>	Neurofibromatosis type 2	Dominant	Inactivation of WT allele	?	Meningioma, acoustic neuroma
<b>Stability genes</b>					
<i>MUTYH</i>	Attenuated polyposis	Recessive	?	BER	Colon
<i>ATM</i>	Ataxia telangiectasia	Recessive	?	CIN	Leukemias, lymphomas, brain
<i>BLM</i>	Bloom syndrome	Recessive	?	CIN	Leukemias, lymphomas, skin
<i>BRCA1, BRCA2</i>	Hereditary breast cancer	Dominant	Inactivation of WT allele	CIN	Breast, ovary
<i>FANCA, C, D2, E, F, G</i>	Fanconi anemia	Recessive	?	CIN	Leukemias
<i>NBS1</i>	Nijmegen breakage syndrome	Recessive	?	CIN	Lymphomas, brain
<i>RECQL4</i>	Rothmund-Thomson syndrome	Recessive	?	CIN	Bone, skin
<i>WRN</i>	Werner syndrome	Recessive	?	CIN	Bone, brain
<i>MSH2, MLH1, MSH6, PMS2</i>	HNPCC	Dominant	Inactivation of WT allele	MMR	Colon, uterus
<i>XPA, C, ERCC2-5, DDB2</i>	Xeroderma pigmentosum	Recessive	?	NER	Skin
<b>Oncogenes</b>					
<i>KIT</i>	Familial gastrointestinal stromal tumors	Dominant	?	RTK	Gastrointestinal stromal tumors
<i>MET</i>	Hereditary papillary renal cell carcinoma	Dominant	Mutant allele duplication	RTK	Kidney
<i>PDGFRA</i>	Familial gastrointestinal stromal tumors	Dominant	?	RTK	Gastrointestinal stromal tumors
<i>RET</i>	Multiple endocrine neoplasia type II	Dominant	Mutant allele duplication	RTK	Thyroid, parathyroid, adrenal

WT, wild type. <sup>a</sup>Representative genes of all the major pathways and hereditary cancer predisposition types are listed. For a complete list, see ref. 117. Approved gene symbols are provided for each entry, with alternative names in parentheses. <sup>b</sup>In many cases, the gene has been implicated in several pathways. The single pathway that is listed for each gene represents a "best guess" (when one can be made) and for the reasons noted in the text and in the legend to Figure 9, should not be regarded as conclusive. APOP, apoptotic pathway; RTK, receptor tyrosine kinase pathway (see Fig. 1). <sup>c</sup>In most cases, the nonfamilial tumor spectrum caused by somatic mutations of the gene includes those occurring in the familial cases plus additional tumor types. For example, mutations of *TP53* and *CDKN2A* are found in many more tumor types than those to which Li-Fraumeni and familial malignant melanoma patients, respectively, are predisposed.

Tabela 6-Proto-oncogenes, oncogenes(31)

A instabilidade genômica é determinante na facilitação de eventos oncogênicos, ( Fig.17), na heterogeneidade tumoral e na resistência terapêutica influenciando o prognóstico dos pacientes (114–119).



**Figura 17-Vias de sinalização reguladas por genes(31)**

### 3.6 Prevenção intervenção

Três estratégias combinadas criam uma abordagem eficaz para prevenir o cancro e melhorar os resultados: a detecção precoce, alterações de estilo de vida e as terapias direcionadas.

A detecção precoce por meio de rastreios como a mamografia e colonoscopia identifica células anômalas antes de estas se tornarem tumores malignos aumentando as taxas de sobrevivência (120). Mudanças do estilo de vida, como a prática regular de exercícios, a cessação do tabagismo, dieta equilibrada, e moderação no consumo do álcool reduzem a inflamação e o stress oxidativo, fatores que contribuem para carcinogênese (121).

Terapias direcionadas incluindo os anticorpos monoclonais e os Inibidores da tirosina quinase (ITQ) visam especificamente anomalias moleculares nas células cancerígenas, retardando a progressão do tumor e minimizando os danos em tecidos saudáveis (122)

### 3.7 Carcinogênese e Microambiente tumoral

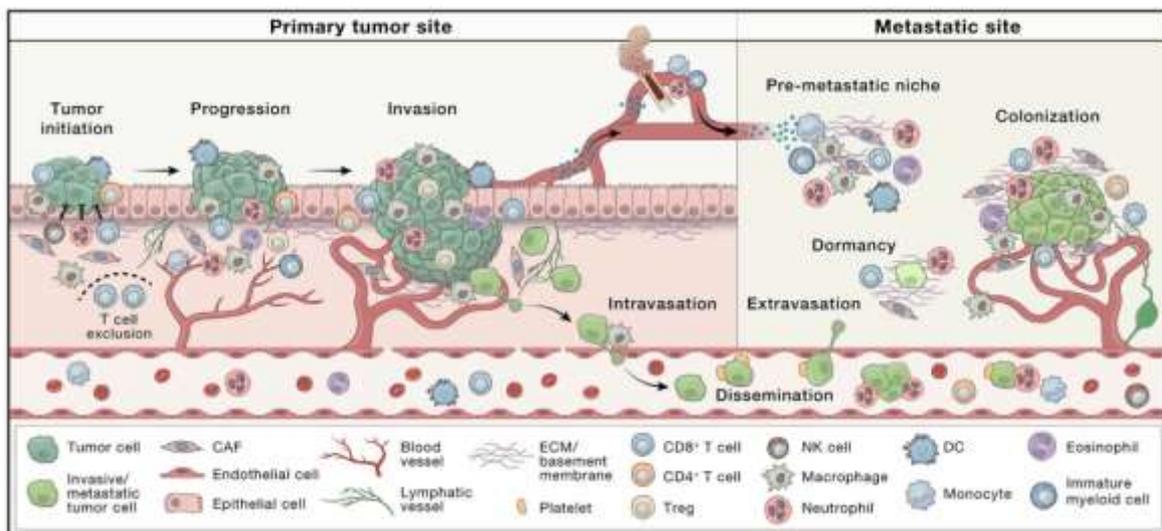
A carcinogênese e o microambiente tumoral-(TME) estão intimamente interligados pois as mutações genéticas, alterações epigenéticas, e desregulação celular promovem a transformação progressiva de células normais em células cancerígenas. Assim, estratégias eficazes para retardar e prevenir a carcinogênese devem-se focar tanto nos componentes do TME quanto nas células cancerígenas, dada a interação dinâmica entre ambos na progressão do cancro.

## 4 Microambiente Tumoral

### 4.1 Introdução

O ecossistema(123) complexo e dinâmico que rodeia as células cancerosas no interior de um tumor e influencia o seu desenvolvimento e progressão define-se com microambiente tumoral (TME).(124–126).

Engloba um conjunto diversificados de componentes celulares que incluem fibroblastos, células imunitárias (células T, macrófagos), células endoteliais, moléculas da matriz extracelular-(ECM), moléculas sinalizadoras e vasos sanguíneos que interagem com as células tumorais, fig.17, desempenham um papel fundamental na promoção ou inibição do seu crescimento bem como na resistência à terapêutica.(15,123,127–132).

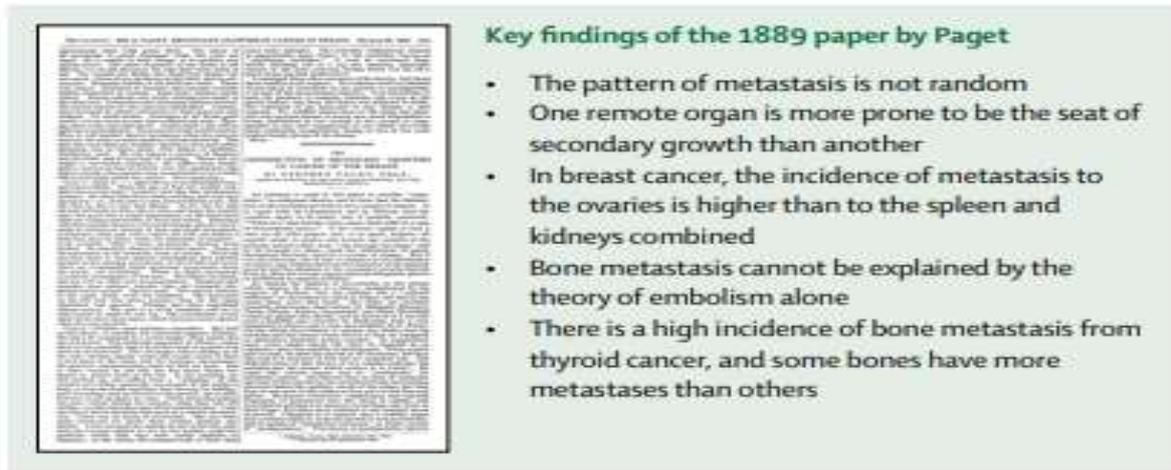


**Figura 18-Os componentes celulares do TME e a sua complexidade(123)**

O crescente reconhecimento do papel do TME no desenvolvimento do cancro tem redirecionado o foco da pesquisa para as interações dinâmicas entre tecidos circundantes, células imunitárias, vasos sanguíneos, matriz extracelular (ECM), e moléculas sinalizadoras. Estas interações, mediadas por redes de sinalização complexas, sustentam o crescimento tumoral e permitem a sua evasão à vigilância imunitária.

As principais descobertas históricas incluem a sugestão de R. Virchow, em 1863, da associação do cancro à inflamação(35), e a hipótese da “semente e do solo” de S. Paget, de 1889, (Fig.19),

que propôs que o ambiente de órgãos distantes poderia influenciar as metástases.(133) Estes primeiros estudos lançaram as bases para a compreensão da forma como o TME pode apoiar ou inibir a carcinogénese e a metástase.



**Figura 19-Artigo original de Paget 1889 e principais conclusões(134)**

A *hipótese da Vigilância Imunitária* (anos 1950-1960) de Thomas e M. Burnet introduziu a ideia do papel do sistema imunitário no TME, (Fig.20). Este conceito foi precursor da compreensão da imunoevasão e imuno-edição do cancro além de abrir caminho para o desenvolvimento de estratégias de imunoterapia. (127,135)(127)

A *hipótese da Angiogénese de Folkman* (1971), propôs que o crescimento tumoral depende da formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese) manipulados pelos tumores para garantirem um suprimento ilimitado de oxigénio e nutrientes, introduzindo a ideia de explorar o microambiente tumoral (TME) como alvo terapêutico. (21,123).

Em 1986 Dvorak mostrou que os tumores atuam como “feridas que não cicatrizam” com os fibroblastos associados ao cancro (CAFs) e células estromais a contribuírem para o TME promovendo a Angiogénese e a invasão tumoral (35,134)

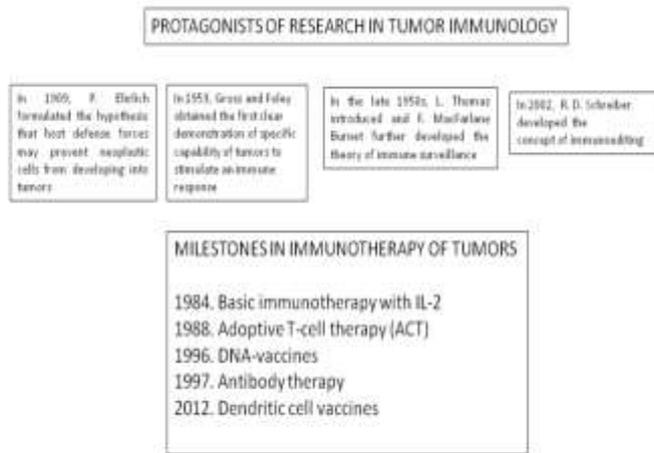


Figure 5: Time sheet of the protagonists of research in tumor immunology and of the milestones in immunotherapy of tumors.

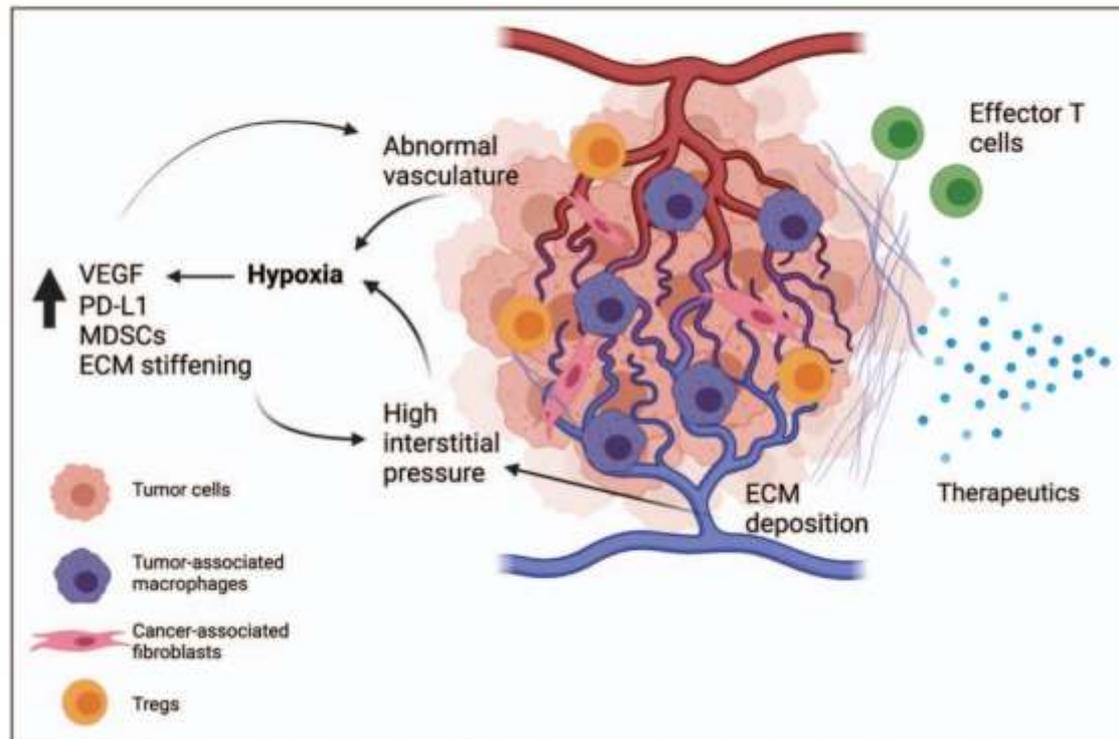
### Figura 20-Milestones in Tumor immunology(136)

Mina Bissel foi pioneira no estudo do *Microambiente Tumoral* e destacou o papel da matriz extracelular (ECM) e da arquitetura tecidual na regulação bidirecional entre as células cancerígenas e o TME e como isso influencia o comportamento tumoral (51,137)

Em 2000, D. Hanahan e R. Weinberg identificaram características chave das células cancerígenas, incluindo a angiogênese sustentada (formação de novos vasos sanguíneos) como fundamental no crescimento tumoral. Evidenciaram também, a interação entre tumores e o microambiente tumoral (TME) como crucial para a sobrevivência do cancro (2,15,16) .

Em 2012, Hanahan e Coussens aprofundaram o papel do TME, destacando a interação entre os tumores e a células do sistema imunitário, identificaram a inflamação crônica e a supressão imunológica na progressão tumoral. Esta investigação realçou a complexidade do sistema imunitário no TME, conduziu a uma compreensão aprofundada da evasão tumoral à detecção imunitária, e contribuiu para avanços na imunoterapia(138), (Fig.20).

Pesquisas subsequentes como as de Quail e Joyce, 2013, (139) e Chen e Mellman, 2017, (140) reforçaram o TME como pedra angular da biologia do cancro e um alvo para novas estratégias terapêuticas (15,125,138,140,141)



**FIGURE 2.** Crosstalk between tumor-associated vasculature, extracellular matrix, and immune cells in the tumor.

### Figura 21-Crosstalk in TME (142)

A heterogeneidade do microambiente tumoral refere-se à diversidade estrutural, celular e molecular que caracteriza o ambiente no qual os tumores se desenvolvem, (Fig.21).

Esta complexidade é influenciada por fatores intrínsecos ao tumor (alterações genéticas e epigenéticas) e extrínsecas como as interações entre as células imunológicas, fibroblastos, vasos sanguíneos e a matriz (ECM)(15).

A heterogeneidade é fundamental para a progressão tumoral, evasão imunológica e a resposta à terapêutica (139)

Os componentes da heterogeneidade no TME incluem a heterogeneidade celular as células tumorais apresentam variação genética e fenotípica entre diferentes regiões do tumor.

As células do sistema imunitário, incluindo os linfócitos T, os macrófagos associados ao Tumor (TAMS), células dendríticas, neutrófilos e células NK, podem apresentar funções antitumorais ou pró-tumorais, dependendo do contexto metabólico, imunológico e espacial. (143,144).

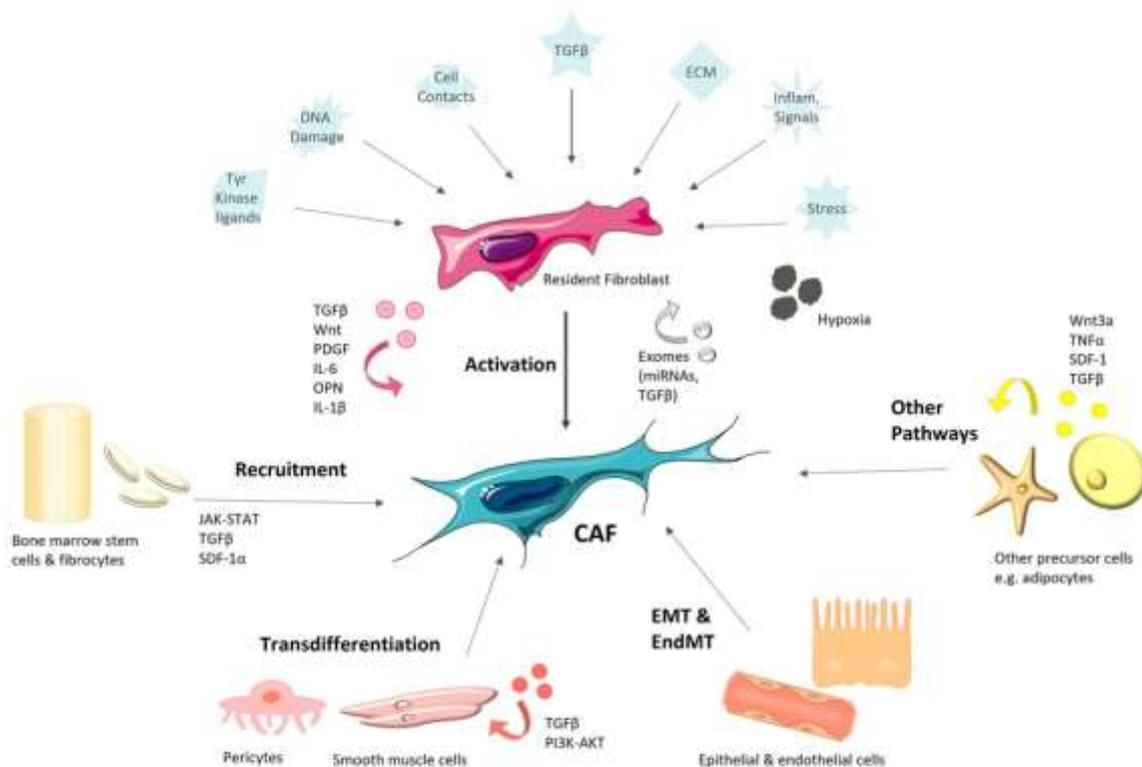
E fatores do microambiente como, a hipóxia, a angiogénese, a imunossupressão, a remodelação da ECM, alterações metabólicas intracelulares, a plasticidade e o dinamismo, que contribuem para o comportamento adaptativo e heterogéneo do TME,(Fig.21), (15,139,145,146).

## 4.2 Heterogeneidade celular

### 4.2.1 *Câncer associated fibroblasts*

Os fibroblastos associados ao cancro (CAFs) são células estromais não cancerosas no microambiente tumoral (TME).

Têm origem nos fibroblastos residentes, células estaminais mesenquimais, perícitos ou noutras células progenitoras, (Fig.22), recrutadas para o local do tumor e são reprogramados por fatores derivados do tumor(147–150).

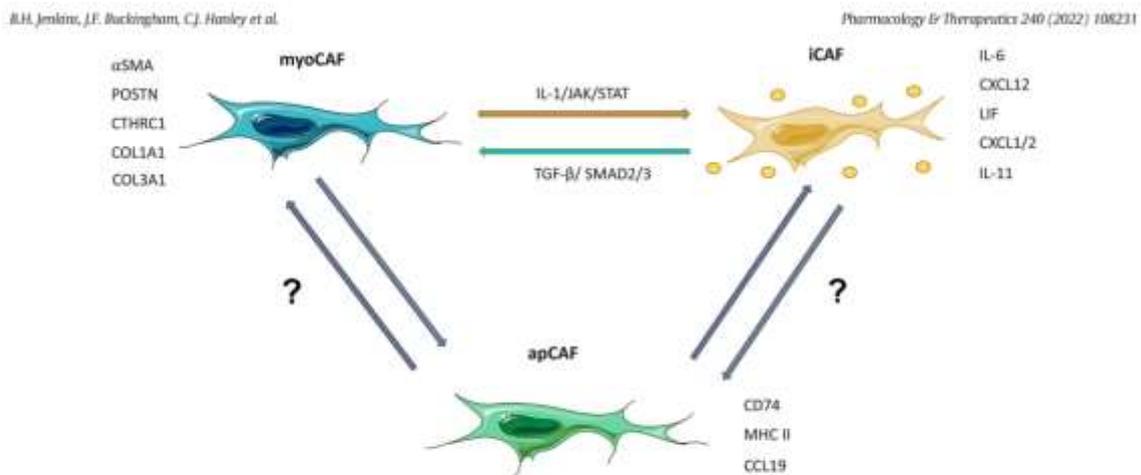


**Fig. 1.** CAF progenitor cells and their activation. CAF Progenitor Cells and their Activation. Cancer-associated fibroblasts can be formed from a variety of precursor cells through multiple mechanisms. Activation of resident fibroblasts is the most well studied mechanism, whereby a range of stimuli, from tumour-secreted factors to physical TME characteristics can trigger activation.

**Figura 22-Células progenitoras dos CAFs(150)**

Os fibroblastos são células fusiformes, que secretam colagénio. O seu citoplasma é rico em retículos endoplasmáticos rugosos. Sintetizam a matriz extracelular dos tecidos conjuntivos e desempenham um papel fundamental na cicatrização de feridas e no cancro.(151–154). Os fibroblastos são designados de fibroblastos associados ao cancro (CAFs) quando estão associados a células estaminais cancerosas (CSC) e facilitam o desenvolvimento do tumor.(153).

Os CAFs são excecionalmente versáteis e heterogéneos, podendo adotar diferentes fenótipos consoante os sinais que recebam do tumor ou do TME. (155–158).



**Fig. 3. CAF subtypes.** CAF Subtypes. CAFs are heterogeneous, with a variety of subtypes/phenotypes observed across different cancer types. Myofibroblastic CAFs (myoCAFs) have been extensively noted in various types of solid tumours for many years, other CAF subtypes have recently been described. Currently, three broad CAF subtypes have emerged from scRNASeq analyses; myoCAF, ICAF (inflammatory) and apCAF (antigen-presenting). myoCAF and ICAF have been found to be regulated by TGF-β/SMAD and IL-1/JAK/STAT signalling respectively, with interconversion demonstrated, underlining CAF plasticity. Whether apCAFs form part of this plastic spectrum remains to be determined.

### Figura 23-Subtipos de CAFs (150)

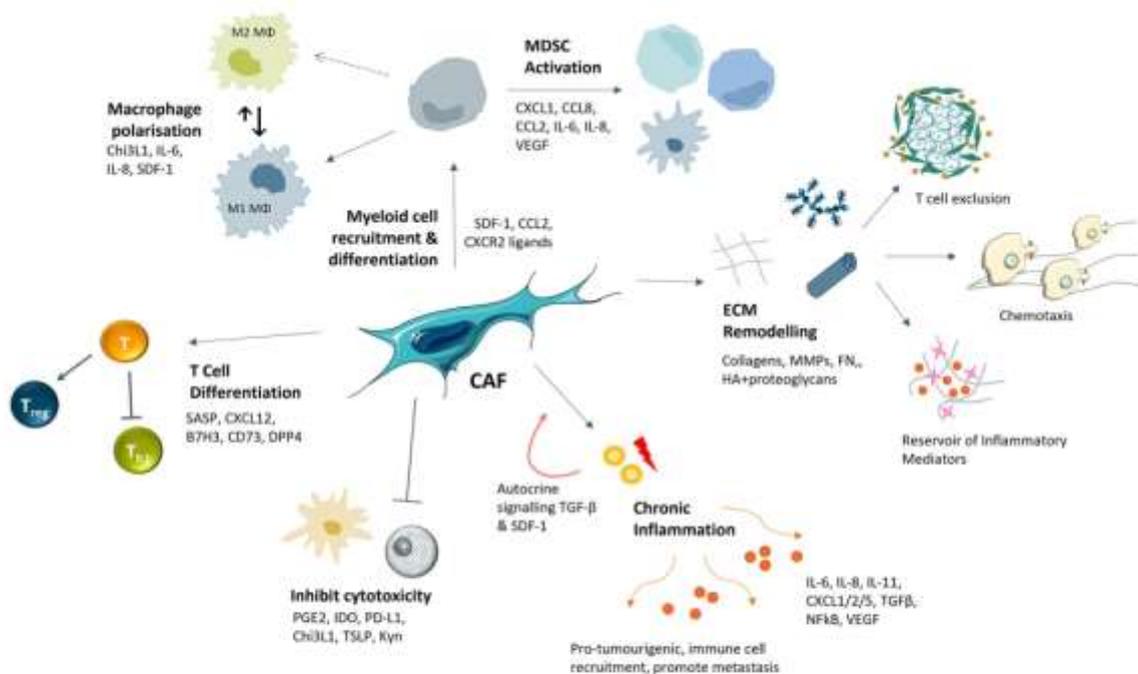
São identificados pela expressão de marcadores, (Fig.23, Tabela 7) como a alfa-actina do musculo ( $\alpha$ \_SMA), a proteína de ativação dos fibroblastos-(FAP) e o recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR)(150,154,159)

Subsets	Markers	Signaling Pathways	Functions	Ref	Therapeutic Targets	
					Not Specific	Probably Specific
vCAFs	PDGFR $\alpha$ , Nidogen-2, Desmin, CD31	PDGF-CC signaling	Angiogenesis	(20)		novel targeted drugs
mCAFs	PDGFR $\alpha$ , Fibulin-1	PDGF-CC signaling	Immunosuppression			
dCAFs	PDGFR $\alpha$ , SCRG1	PDGF-CC signaling	Migration	(36–39)	CAR T-cell therapy, $\alpha$ FAP therapy, Oncolytic virus-based therapies,	Galunisertib, Losartan, Nab-paclitaxel
Myofibroblasts	$\alpha$ -SMA <sup>high</sup> , FAP <sup>+</sup> , CTGF <sup>+</sup> , TNC <sup>+</sup> , TAGLN <sup>+</sup>	(TGF- $\beta$ and IL-1/ JAK-STAT signaling	Migration, Invasion, Metastasis			
Inflammatory fibroblasts,	PDPN, IL-6, $\alpha$ -SMA <sup>Low</sup> , LIF	NF- $\kappa$ B signaling	Metastasis, Angiogenesis,			–
Antigen-presenting CAFs	PDPN, Saa3, MHC-II gene, CD74	MTORC1 signaling	Immunosuppression			
CD10 <sup>+</sup> / GPR77 <sup>+</sup> CAFs	CD10, GPR77, IL-6	NF- $\kappa$ B signaling	Proliferation,	(35, 40, 41)	Vitamin D, Vitamin A, DNA vaccine	–
CAF-S1	$\alpha$ -SMA, PDGFR $\beta$ , FAP, FSP1, Collagen 1 FAP <sup>high</sup> , CD29 <sup>Mod-high</sup> , $\alpha$ -SMA <sup>high</sup> , PDPN <sup>high</sup> , PDGFR $\beta$ <sup>high</sup>	TGF $\beta$ -signaling, CXCL12 signaling	Migration, Chemoresistance Proliferation, Migration, Invasion, Metastasis, Immunosuppression	(42–45)		$\alpha$ FAP therapy, Dasatinib, Galunisertib
CAF-S2	FAP <sup>Neg</sup> , CD29 <sup>Low</sup> , $\alpha$ -SMA <sup>Neg-Low</sup> , PDPN <sup>Low</sup> , PDGFR $\beta$ <sup>Low</sup>	Not Describe	Not Describe			–
CAF-S3	FAP <sup>Neg-Low</sup> , CD29 <sup>Mod</sup> , $\alpha$ -SMA <sup>Neg-Low</sup> , PDPN <sup>Low</sup> , PDGFR $\beta$ <sup>Low-Mod</sup>	Not Describe	Not Describe			–
CAF-S4	FAP <sup>Low-Mod</sup> , CD29 <sup>high</sup> , $\alpha$ -SMA <sup>high</sup> , PDPN <sup>Low</sup> , PDGFR $\beta$ <sup>Mod</sup>	NOTCH signaling	Proliferation, Migration, Invasion, Metastasis			Dasatinib

**Tabela 7-Marcadores associados aos CAFs e a sua heterogeneidade (160)**

Esta versatilidade permite-lhes desempenhar múltiplas funções, tais como mediadores autócrinos e parácrinos que controlam a influencia trófica nas células cancerígenas através da estimulação.(123,150,154–156,161) .

Ao produzirem diferentes citocinas e quimiocinas como por exemplo a Interleucina -6 (IL-6) e fatores de crescimento como o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e CXCL12, ativam diferentes vias de sinalização que resultam na orquestração de processos como a proliferação e remodelação da *matriz extracelular* (ECM) , imunossupressão, (Fig. 24), transição epitelial-mesenquimal, resistência farmacológica e angiogénese, (15,150,154).



**Fig. 2. CAF immune Effects.** Cancer-associated fibroblasts mediate a complex variety of immunological effects that affect most immune cell populations, generally producing an immuno-suppressive tumour microenvironment that contributes to immunotherapy resistance. CAF, particularly iCAF, secrete a variety of inflammatory factors that activate a multitude of pro-tumourigenic pathways; these include CCL2-CCR2-dependent MDSC activation and SDF-1-CXCR4-dependent CSC proliferation. Expression of various chemo-attractants recruits immune cells to the TME, where they can be co-opted into developing an immune-suppressive, tumour supportive environment. For example, macrophages become polarised towards a tumourigenic M2 subtype; FoxP3+ regulatory T-cells are favoured over activated CD8+ T-cells; cytotoxic CD8+ T-cells are inhibited from infiltrating the TME, along with dendritic cells and natural killer cells via several CAF secreted factors. CAF-mediated deposition of collagens, fibronectins, and other extracellular matrix components also can suppress CD8+ T-cell infiltration.

4

## Figura 24-Papel no CAFs nos processos imunológicos (150).

Estudos recentes identificam múltiplos subtipos de CAF's, cada um com marcadores específicos e funções distintas, (Tabela ), no microambiente tumoral (TME):

1. **CAF's produtores de matriz (mCAFs):** são responsáveis pela síntese de matriz extracelular (ECM), criando barreiras físicas que impedem a infiltração de células T, prejudicando respostas imunes (162).
2. **CAF's imunomoduladores (iCAFs),** caracterizados pela expressão de citocinas e quimiocinas. São fundamentais para o recrutamento e modulação de células imunitárias. Contribuem para a evasão imunitária e promovem a carcinogénese associada á inflamação (163).
3. **CAF's miofibroblásticos ( $\alpha$ -SMA positivos),** encontrados em cancros agressivos, como cancros da mama do tipo basal, estão implicados no aumento do crescimento e invasão do tumor por meio das vias de sinalização TGF- $\beta$  (164). Além disso, técnicas emergentes de imagem, destacam o potencial terapêutico de direcionar CAFs para o tratamento do cancro, como no caso dos inibidores de FAP (FAPis) (165,166).

A heterogeneidade dos CAFs sublinha o seu papel duplo, tanto na promoção, quanto ocasionalmente, na inibição da progressão tumoral destacando a importância de estratégias terapêuticas específicas para direcionar a sua atividade no TME (156,160).

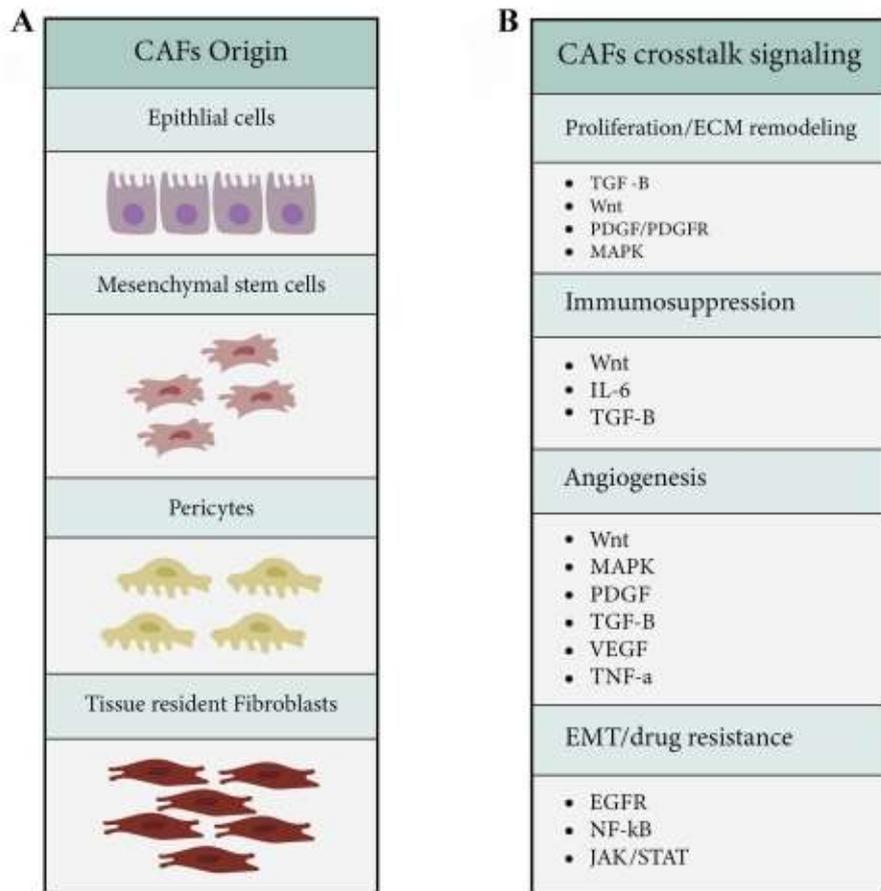
As principais vias de sinalização envolvidas no funcionamento dos CAFs,( Fig.25), incluem:

A via do ***Transforming Growth Factor Beta (TGF-β) SMAD dependente***, que regula a ativação dos CAFs e está envolvida na remodelação da matriz extracelular ao ativar os fibroblastos; induz a produção de metaloproteínas da matriz (MMPS), que degradam componentes da ECM e aumentam a sua remodelação; estimula a transição epitelial mesenquimal (EMT) e influencia a supressão imunológica.

É uma das vias mais estudadas devido á sua dualidade em promover ou suprimir tumores dependendo do contexto tumoral. (167–170). No TME, esta via de sinalização promove ainda, a fibrose, e acúmulo de CAFs; estes efeitos contribuem para o crescimento tumoral, a angiogénese e as metástases(164,171).

**Via *PI3K/AKT/mTOR***: essencial para a sobrevivência das células cancerígenas e proliferação tumoral. OS CAFs promovem a ativação desta via em células tumorais através da secreção de fatores de crescimento como o VEGF e o PDGF, contribuindo para a angiogénese, remodelação metabólica e resistência à apoptose (170).

**Via *Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-Ras/Raf/MEK/ERK pathway***- É crítica para os processos de proliferação, diferenciação e migração celular. Esta via é frequentemente ativada em resposta a fatores de crescimento secretados pelos CAFs como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o qual regula a expressão de genes pró-tumorais. Aberrações nesta via, como por exemplo mutações no RAS *raT sacoma G-protein family* (30% dos cancros) ou no *RAF-1 Proto-oncogene, serine/treonine Kinase* (mutações no BRAF no melanoma) conduzem a proliferações celulares descontroladas e metastização. (172–174).



**Figura 25-Vias de sinalização dos CAFs (175)**

A Via **JAK/STAT** regula o comportamento e a heterogeneidade dos *CAFs*. Estimulada por citocinas como a IL-6 e o LIF, a ativação da *JAK/STAT* conduz á diferenciação dos *CAFs* inflamatórios (*iCAFs*) que secretam citocinas pró-inflamatórias promotoras do crescimento tumoral e da supressão imunitária.

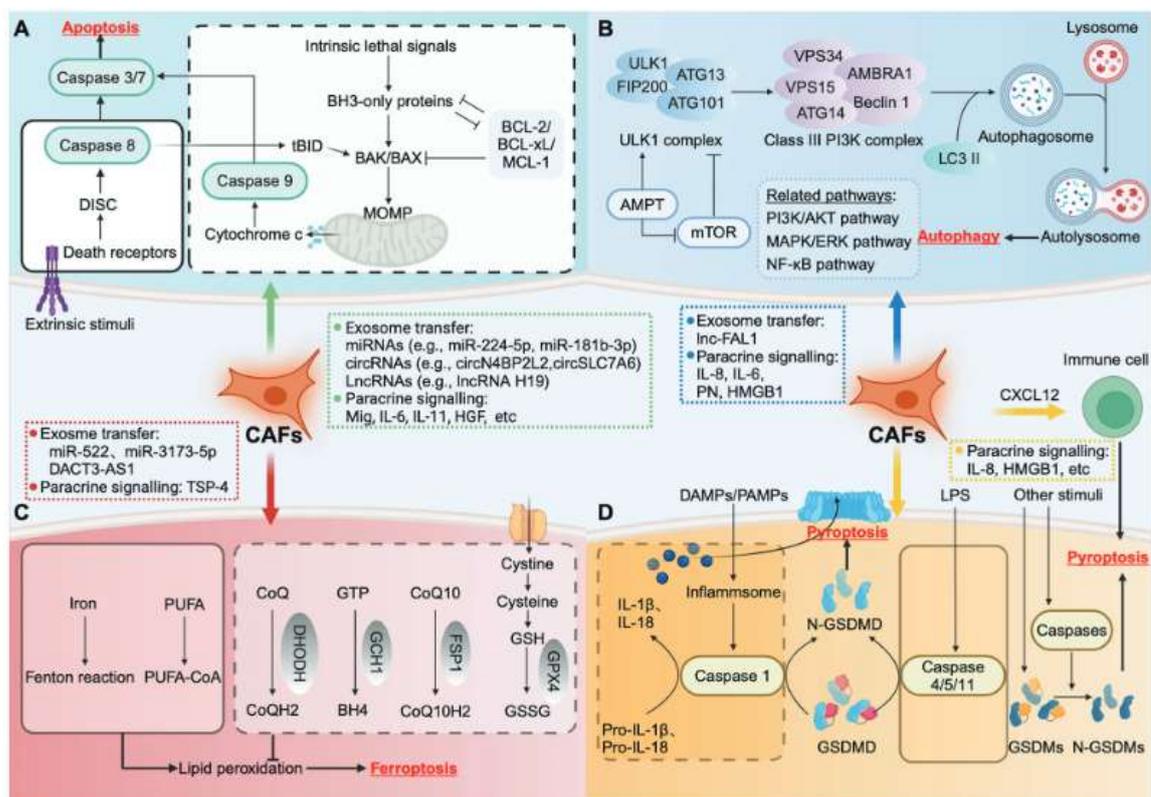
Este processo é contrabalançado pelo *Tumoral growth factor-Beta* (TGF- $\beta$ ), que inibe os *iCAFs* e promove os *CAFs* miofibroblásticos (*myCAFs*). Adicionalmente os *CAFs* utilizam a sinalização JAK/STAT para modular respostas imunitárias, recrutando células T reguladoras imunossupressoras e polarizando macrófagos associados a tumores (*TAMs*) para estados pró-tumorigénicos, o que auxilia ainda mais a evasão imunitária e a progressão tumoral.(170,176,177).

A via **Wnt/B catenina** contribui para a rigidez e arquitetura da ECM, facilitando a migração e invasão das células tumorais. (178–180).

Via *do Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer* *NF- $\kappa$ B*- sustenta a inflamação crônica, e a produção de citocinas que promovem a proliferação de células tumorais, que suprimem a apoptose e estimulam a angiogênese, favorecendo a sobrevivência tumoral e as metástases, bem como induz a transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) (181–186)

Recentes evidências indicam que os CAFs modulam diversos mecanismos de regulação da morte celular (RCD),( Fig 26) (186).

Estas vias são alvo de muito interesse e investigação em terapias inovadoras.



**Fig. 2 Core molecular mechanisms of different types of RCD and the potential CAF-derived molecules that regulate RCD.** **A** The extrinsic pathway (left) is triggered by the activation of death receptors, such as TNFR1, Fas, and the TRAIL receptors DR4 and DR5. This leads to the formation of DISCs and the activation of caspase 8. The intrinsic pathway (right) is initiated by intracellular signals, such as DNA damage, cellular stress, and loss of survival signals, resulting in mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and subsequent release of cytochrome c from mitochondria. This triggers the activation of caspase 9. Activated caspase 8 and caspase 9 cleave downstream caspase 3 and caspase 7, which mediate the execution of apoptosis. **B** Autophagy initiation is mediated by the ULK complex, which eventually activates the class III PI3K complex. This complex produces PI3P on autophagic membranes to recruit the autophagy conjugation machinery, which is subsequently transformed into the autophagosome. The autophagosome then fuses with lysosomes to form autolysosomes. **C** The central biochemical and metabolic event in ferroptosis is oxidative damage to cellular membranes resulting from the abnormal accumulation of lethal lipid peroxidation products within cells. This effect is mainly caused by an imbalance between ferroptosis-driving (left) and ferroptosis-defense (right) mechanisms. The classic antioxidant network includes the GPX4-GSH system, the FSP1-CoQ10 system, the DHODH-CoQH2 system, and the GCH1-BH4 system. **D** Pyroptosis is mediated through two main mechanisms: the canonical (left) and noncanonical pathways (middle). The canonical pyroptosis pathway responds to cell DAMPs and PAMPs, leading to inflammasome formation. Inflammasomes then recruit proteins to activate caspase-1, which subsequently cleaves GSDMD and promotes IL-1 $\beta$ /IL-18 maturation. In the noncanonical pathway, caspases-4/5/11 are activated by cytosolic LPS, triggering pyroptosis by cleaving GSDMD. CAFs have been shown to modulate different types of RCD, including apoptosis, autophagy, ferroptosis, and pyroptosis, mainly through exosomal secretion and paracrine signaling pathways.

**Figura 26-Mecanismo de regulação da morte celular mediadas por CAFs (186)**

## 4.2.2 Células imunitárias no microambiente tumoral

O microambiente tumoral (TME) alberga uma variedade de células imunitárias, ( Fig.27-29), onde se inclui, macrófagos, células T, células dendríticas e células natural killer (NK) cada uma com características e fenótipos únicos, que desempenham funções críticas na modelação do crescimento tumoral na sua progressão, na resposta imunológica, na invasão e na resposta ás terapias (187,188)

Cell type	Function in the TME	References
<b>Immune cells</b>		
<b>Adaptive immune cells</b>		
CD8 <sup>+</sup> T cells 	CD8 <sup>+</sup> T cells are powerful effector cells in the anti-tumor immune response. CD8 <sup>+</sup> T cells can specifically recognize cancer cells by binding with their T cell receptor (TCR) to MHC-peptide complexes expressed by cancer cells. Upon TCR engagement, CD8 <sup>+</sup> T cells destroy target cells through granzyme and perforin-mediated apoptosis or via FASL-FAS-mediated cell death. In tumors, many different CD8 <sup>+</sup> T cell states can be found. Often, intratumoral CD8 <sup>+</sup> T cells have a dysfunctional or exhausted phenotype. Immune checkpoint blockade aims to unleash CD8 <sup>+</sup> T cell responses against cancer.	Philip and Schietinger, <sup>61</sup> van der Leun et al. <sup>63</sup>
CD4 <sup>+</sup> T cells 	CD4 <sup>+</sup> helper T cells influence a variety of other immune cells; in particular, they contribute to effective CD8 <sup>+</sup> T cell responses. In cancer, CD4 <sup>+</sup> T cells play a dual role. In particular, the Th1 subtype of CD4 <sup>+</sup> T cells exerts anti-tumorigenic functions by providing help to anti-tumor cytotoxic CD8 <sup>+</sup> cells and B cells and by direct killing of cancer cells via the production of interferon $\gamma$ (IFN $\gamma$ ) and TNF- $\alpha$ . On the other hand, the Th2 subtype secretes anti-inflammatory mediators that exert pro-tumoral functions. There is growing evidence that CD4 <sup>+</sup> T cells may play important roles in efficacy of immune checkpoint blockade (ICB).	DeNardo et al., <sup>49</sup> Borst et al. <sup>328</sup>
Tregs 	Regulatory T cells (Tregs) are a highly immunosuppressive subset of CD4 <sup>+</sup> T cells and function as gatekeepers of immune homeostasis. Tregs can be subdivided into thymic-derived and peripherally induced Tregs. In cancer, Tregs suppress effective anti-tumor immunity through different mechanisms. Their exact effector program is dependent on context-dependent cues. Treg-targeted cancer therapies are under investigation but are challenging given the key role of Tregs in preventing autoimmunity.	Togashi et al. <sup>329</sup>
B cells 	B lymphocytes are key mediators of humoral immunity. In cancer, B cells can exert anti-tumor effects through antibody-dependent cell cytotoxicity and complement activation. B cells can reside in intratumoral tertiary lymphoid structures (TLSs), where they contribute to T cell activation via antigen presentation. B cells can also support tumor growth by promoting inflammation and immunosuppression via secretion of anti-inflammatory and pro-angiogenic mediators, via immune-complexes, and via complement activation. A subpopulation of immunosuppressive B cells, Bregs, are involved in immunological tolerance.	Yuen et al., <sup>330</sup> Laumont et al. <sup>331</sup>

Figura 27-Celulas imunitárias adaptativas (123)

## Myeloid immune cells

### Macrophages



Tumor-associated macrophages (TAMs) represent a highly plastic immune cell population with both pro- and anti-tumorigenic functions. TAMs comprise multiple subsets that arise from different origins (yolk sac-derived tissue-resident macrophages or bone marrow-derived infiltrating macrophages). Moreover, multiple TAM subsets co-exist in tumors. Pro-tumorigenic functions of TAMs include promoting angiogenesis, immunosuppression, metastasis formation, and therapy resistance, while TAMs can also counteract cancer progression by direct phagocytosis of cancer cells or activation of anti-tumor immune responses.

Guc and Pollard,<sup>68</sup>  
DeNardo and Ruffell<sup>67</sup>

### Neutrophils



Neutrophils are the most abundant immune cells in blood. Besides their recruitment to primary tumors, neutrophils frequently accumulate in blood and distant organs of tumor-bearing hosts. Depending on cues from the TME and their maturation status, neutrophils can exert anti- or pro-tumorigenic functions. Their systemic accumulation contributes to immunosuppression and extracellular matrix (ECM) remodeling in distant organs, which promote (pre)metastatic niche formation. Neutrophil diversity and plasticity in cancer is a topic of intense investigation.

Guc and Pollard,<sup>68</sup>  
Jaillon et al.<sup>332</sup>

### Monocytes



Monocytes circulate in the bloodstream and migrate into tissues where they differentiate into macrophages and dendritic cells (DCs). Several subtypes of monocytes exist, including classical, non-classical, and intermediate monocytes. Recent single-cell RNA sequencing studies demonstrated additional monocyte subpopulations. In cancer, monocytes exert pro- and anti-tumoral functions. Monocytes can produce tumoricidal mediators and stimulate natural killer (NK) cells. However, in the TME, they contribute to immunosuppression, ECM remodeling, angiogenesis, and cancer cell intravasation. Moreover, they differentiate into tumor-supporting TAMs.

Olingy et al.<sup>333</sup>

### DCs



DCs are a diverse group of antigen-presenting cells critical for initiating and regulating adaptive immune responses. By integrating information from the TME and relaying it to other immune cells, most notably T cells, DCs have the potential to shape anti-tumor immunity. However, tumors, in turn, employ a variety of strategies to limit and manipulate DC activity to evade immune control. Harnessing the power of DCs to improve immunotherapy response and the development of DC-based vaccines is an active field of cancer research.

Gerhard et al.,<sup>334</sup>  
Wculek et al.<sup>335</sup>

### Mast cells



Mast cells are granulocytes that mediate host defense and maintenance of homeostasis by swiftly degranulating histamines, cytokines, and chemokines. They are well known for their role in allergies and autoimmunity, but they can also infiltrate tumors. Mast cells exert both pro- and anti-tumorigenic activities depending on the microenvironmental stimuli. They can directly target tumor cells, but they mainly regulate the recruitment and activity of other immune populations and the endothelium.

Majorini et al.<sup>336</sup>

### Eosinophils



Eosinophils are known for their role in allergic diseases and parasite infections. More recently, their function in the TME is becoming apparent. Eosinophils have the capacity to directly kill tumor cells via the release of cytotoxic molecules, but eosinophils can also modulate the tumor vasculature and regulate the immune composition of the TME, and as such, they can have both pro- and anti-tumorigenic functions depending on the activation signals they receive. In addition, there is a growing interest in the role of eosinophils in promoting immunotherapy response.

Grisaru-Tal et al.,<sup>337</sup>  
Blomberg et al.<sup>338</sup>

### Myeloid-derived suppressor cells



Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population of myeloid cells, consisting of (immature) monocytic and neutrophilic cells with potent immunosuppressive capacities. These cells expand in patients with cancer and mouse cancer tumor models, and their presence in the TME is associated with poor clinical outcome. MDSCs suppress T cells, NK cells, B cells, and DCs via paracrine and cell-cell contact mechanisms.

Veglia et al.<sup>105</sup>

### Platelets



Platelets, also named thrombocytes, are fragments of cytoplasm derived from megakaryocytes in the bone marrow. Platelets lack a nucleus, are abundant in blood, and are essential for blood clotting. Platelets promote tumor progression and metastasis through a range of different mechanisms. They bind to circulating tumor cells (CTCs), promoting CTC survival by shielding them from physical stress and immune attack. Platelets also release pro- and anti-angiogenic mediators, and they bind to endothelial cells, through which they modulate angiogenesis and vascular integrity. Platelets contribute to tumor-associated inflammation and immune evasion by activating myeloid cells.

Braun et al.<sup>339</sup>

**Figura 28-Linhagem mieloide (123).**

*Immune cells at the interface of adaptive and innate immunity*

<p>NK cells</p> 	<p>NK cells are cytotoxic innate lymphoid cells. They recognize and kill stressed cells that lack MHC class I expression. Circulating and intratumoral NK cell levels are predictive for improved survival in patients with cancer. NK cells have potent anti-cancer abilities; however, progressing tumors evade elimination by NK cells via several mechanisms, such as the upregulation of inhibitory receptors that diminish NK cell cytotoxicity and the mobilization of immunosuppressive myeloid cells and Tregs. There is a growing interest in utilizing NK cells in the next generation of immunotherapeutic modalities either by engaging endogenous NK cells or by NK cell-based cellular therapies.</p>	<p>Chan and Ewald<sup>340</sup></p>
<p>Invariant NK T cells</p> 	<p>Invariant NK T (iNKT) cells are CD1d-restricted lipid-specific T lymphocytes that bridge innate and adaptive immunity and can mediate a plethora of immune functions depending on tissue distribution. In several experimental models, iNKT cells exert cancer immunosurveillance through direct tumor cell killing or by orchestrating the activity of both pro- or anti-tumorigenic immune cells. Cancer-associated immunosuppression can skew iNKT cell activity toward more regulatory functions.</p>	<p>Fujii and Shimizu<sup>341</sup></p>
<p>Gamma delta T cells</p> 	<p>Gamma delta (<math>\gamma\delta</math>) T cells form an unconventional T cell population expressing <math>\gamma\delta</math> TCRs, but not <math>\alpha\beta</math> TCRs, that recognize target antigens in an MHC-independent manner. Depending on the subset, <math>\gamma\delta</math> T cells exert effector or regulatory functions. In cancer, <math>\gamma\delta</math> T cells may promote disease progression by suppressing anti-tumor immune responses via the production of cytokines, including IL-17. Anti-tumor immunity can also be induced by <math>\gamma\delta</math> T cells via direct cytotoxicity mediated by TCR- or NK-receptor interactions or production of effector molecules.</p>	<p>Silva-Santos et al.<sup>342</sup></p>
<p>Innate-like lymphocytes</p> 	<p>Innate-like lymphocytes (ILCs) are a highly diverse group of immune cells that reside in tissues and that function at the intersection of adaptive and innate immunity. Besides NK cells, ILCs include ILC1s, ILC2s, and ILC3s. ILCs lack antigen-specific receptors and exert their immunoregulatory functions through secretion of a diverse array of cytokines and other inflammatory mediators. In cancer, ILCs play opposing roles. Depending on the tumor types and on cues from the TME, a different composition and activation phenotype of ILC subsets can be found in human tumors. Our understanding of the roles of the different ILCs subtypes in cancer is still very limited.</p>	<p>Bruchard and Ghiringhelli<sup>343</sup></p>

**Figura 29-Células imunitárias da interface da imunidade inata e adaptativa (123)**

As citocinas e fatores de crescimento libertadas pelas células tumorais e estromais do TME, como a Il-10, o TGF- $\beta$  e o VEGF têm um impacto profundo na diferenciação das células imunitárias, influenciando e direcionado a expressão das características fenotípicas (Fig, 30), que suportam o crescimento e a evasão imunitária em vez da atividade antitumoral e que levam os macrófagos, células T e células dendríticas a estados imunossupressores. (189–191).

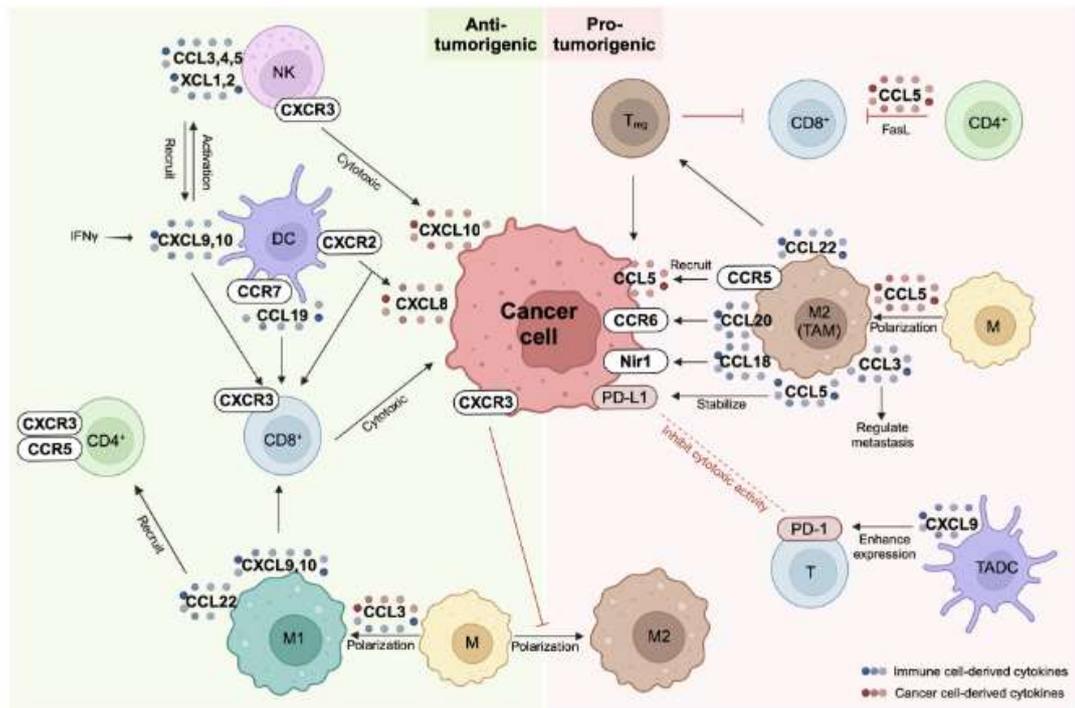


FIGURE 1

Chemokine network between immune cells and cancer cells. Chemokine receptors (CCR or CXCR) and their ligands (CCL or CXCL) are expressed on cancer cells and a variety of immune cells including natural killer (NK) cells, dendritic cells (DC), macrophages (M), and T cells. The same chemokine can exhibit either anti-tumorigenic or pro-tumorigenic properties depending on the specific cell type it interacts with. For instance, macrophages display anti-tumorigenic characteristics when polarized to M1 and pro-tumorigenic attributes when polarized to M2. NK cells and CD8 $^+$  T cells contribute to cancer cell elimination through cytotoxic actions, representing pivotal players in the immune response against tumors. On the other hand, PD-1/PD-L1 interactions occurring between cancer cells and T cells serve to suppress T cell activity, contributing to immune evasion. Additionally, regulatory T (Treg) cells, tumor-associated dendritic cells (TADC), and M2 macrophages collectively contribute to the establishment of an immunosuppressive environment within the tumor microenvironment. These intricacies highlight the complex interplay between various immune cell types and the tumor cells in shaping the dynamics of cancer progression and response to immunotherapy. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

### Figura 30-As citocinas e as vias de sinalização (191)

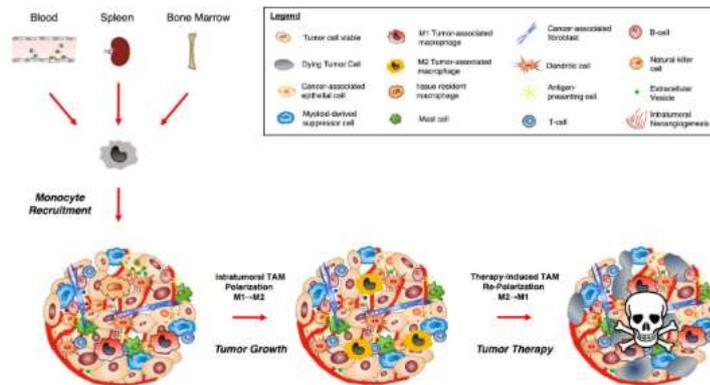
As células imunitárias desempenham um papel multifacetado e dinâmico no TME onde podem inibir ou apoiar o crescimento do tumor dependendo do seu subtipo e estado funcional (143,160,192).

#### Macrófagos

Os macrófagos têm um papel fundamental na imunidade inata e adaptativa caracterizando-se pela sua heterogeneidade fenotípica e funcional. Estas células derivadas da linhagem mononuclear fagocítica, participam da inflamação, da imunidade sistêmica e tecidual, realizam a fagocitose, participam da apresentação de antígenos, defesa antimicrobiana e secreção de citocinas componentes do complemento (193–195).

Os macrófagos associados a tumores (TAMs), são um subtipo especializado, (Fig.31), recrutado para o TME. São provenientes dos monócitos circulantes; Os TAMs diferenciam-se em

macrófagos no tecido tumoral, e são moldados por citocinas e sinais locais. Ao contrário dos macrófagos típicos que respondem principalmente a agentes patogênicos e a lesões, os TAMs são frequentemente “reprogramados” pelo TME, para apoiar o crescimento do tumor, a angiogênese e a imunossupressão (196–199)



**Figure 2.** Monocyte recruitment and TAM polarization during tumor development and therapy. Monocytes from different compartments (bone marrow, blood, spleen) are directed to the tumor microenvironment (TME) via secreted factors and exosomes. Here, they differentiate into TAMs of different subtypes (M1/M2). Therapies leading to the repolarization of M2 TAMs into M1 TAMs or monocytes are promising strategies for tumor destruction.

### Figura 31-Recrutamento e diferenciação dos TAM (199)

Os TAMs exibem plasticidade funcional, (Fig.32), frequentemente expressando o fenótipo do Tipo M2 que está associado à reparação tecidual, cicatrização e funções anti-inflamatórias (200). Nos tumores, este perfil M2 promove a remodelação da ECM e suprime a imunidade antitumoral, criando um ambiente imunossupressor, que favorece a evasão tumoral (201).

Em contrapartida, os macrófagos M1, que têm características pro-inflamatória e anti tumorais são raros em muitos tumores, devido á influencia do TME, que suprime a sua diferenciação e promove a polarização para o tipo M2.

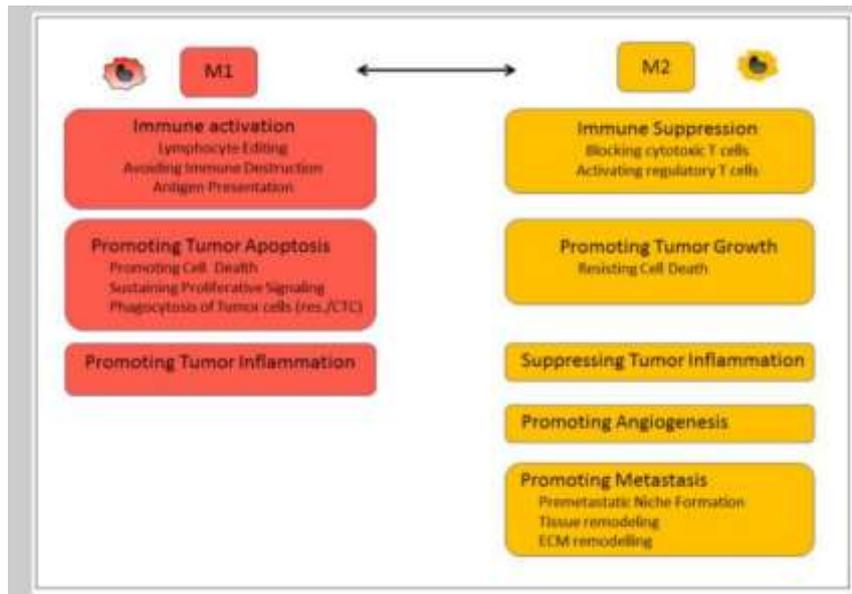


Figura 32-Os subtipos de TAMs e a sua plasticidade funcional (199)

A presença predominante de TAMs do tipo M2 está associada a piores prognósticos clínicos, uma vez que estes contribuem para: a angiogênese; as metástases; a sobrevivência das células-tronco cancerígenas; e supressão da atividade das células T, (Fig. 33), (194,199–203)

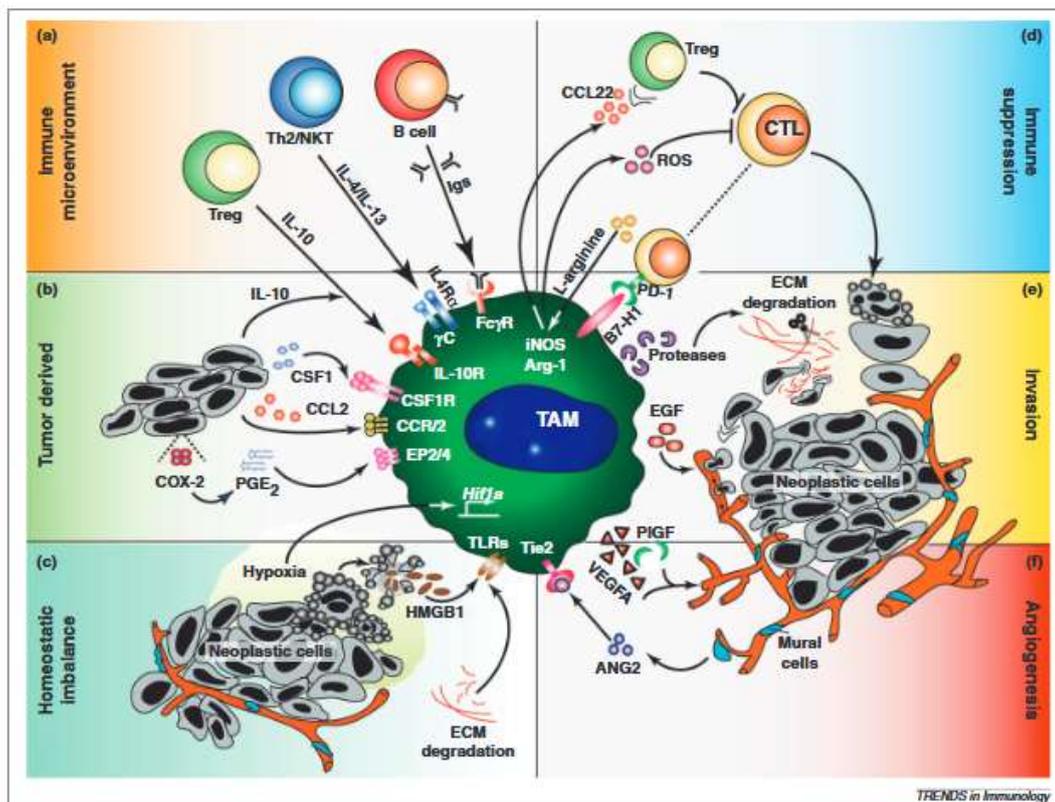


Figure 2. TAMs as central regulators of the tumor microenvironment. Factors that promote the polarization of TAMs towards a protumor phenotype (a–c) can be subdivided into those derived from the immune system, actively produced by tumor cells, or resulting from tissue stress. (a) From leukocytes, this includes cytokines and other soluble factors such as immune complexes. (b) Neoplastic cells can produce chemokines that recruit macrophages, including CSF1 and CCL2, depending on the tissue involved, as well as directly producing immunosuppressive molecules such as IL-10 and PGE<sub>2</sub>. (c) Signs of dysregulated tissues include leaky vasculature, hypoxia, ECM remodeling and cell death. These signals all direct the protumor functions of TAMs (d–f) including immune suppression, tumor cell dissemination, and promoting angiogenesis. (d) Immune suppression can occur through soluble or cell surface mediators, and may be indirect such as through the recruitment of regulatory T cells. (e) Neoplastic cell invasion

Figura 33-TAMs são reguladores no TME (203)

## Celulas T

Os linfócitos T, são um subconjunto de glóbulos brancos envolvidos na imunidade adaptativa. Tem origem na medula óssea e amadurecem no timo. São caracterizadas pelo seu recetor de células T (TCR), Fig. 34, que reconhece antígenos específicos apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Este reconhecimento é fundamental para o seu papel nas respostas imunitárias, incluindo a destruição de células infetadas ou cancerosas e a regulação de outras células imunitárias. (204–208).

Os principais subconjuntos incluem as células T citotóxicas (CD8+), que matam as células alvo, e as células CD4+, que coordenam as respostas imunitárias (204)

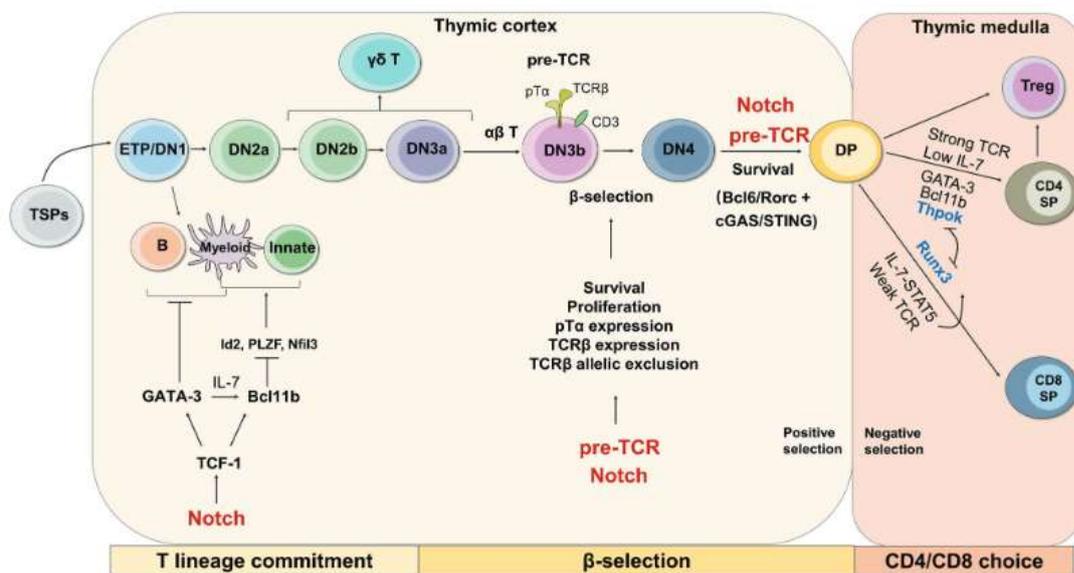


Figura 34-Mecanismo regulador do desenvolvimento dos tímócitos (204)

As células T CD8+ citotóxicas são fundamentais para a imunidade antitumoral. Reconhecem os antígenos tumorais apresentados pelas moléculas MHC de classe I e, após ativação, podem matar diretamente as células tumorais através da libertação de perforinas e granzinas (204).

No TME as células T CD8+ tornam-se disfuncionais ou “exaustas” devido à exposição crónica a antígenos, a níveis elevados de sinalização inibitória e à depleção de nutrientes. Esta exaustão é marcada por recetores inibitórios regulados positivamente como por exemplo o PD-1, CTLA-4 (209–213).

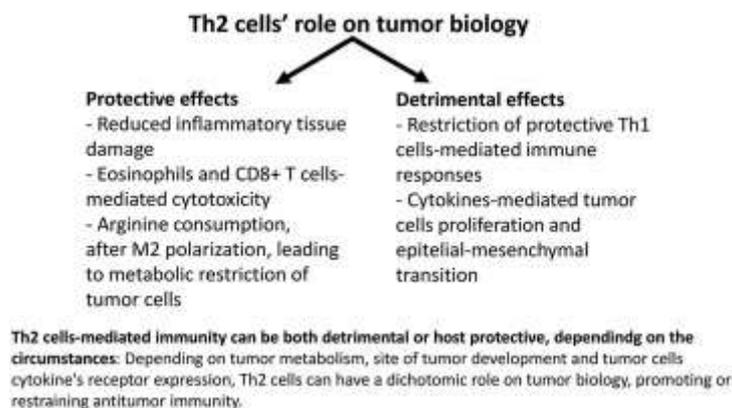
## **Células T Helper (CD4+)**

As células T CD4+ são fundamentais na imunidade adaptativa e têm diferentes papéis no TME, dependendo do seu fenótipo. Regulam a resposta imunitária no microambiente tumoral (TME), apoiando as células T citotóxicas através da libertação de citocinas que recrutam outras células imunitárias (214,215)

Exibem plasticidade dentro do TME, diferenciando-se em vários subgrupos (Th1, Th2, Th17, Tregs), cujo fenótipo é moldado por citocinas derivadas do tumor, restrições metabólicas e hipóxia (216)

As células **Th1** apoiam a imunidade antitumoral ao produzir citocinas como IFN $\gamma$ , que aumenta a atividade das células TCD8+ e dos macrófagos (214,215)

As células **Th2**, Fig 35, contribuem para um TME imunossupressor através da produção de citocinas como a IL-4; IL-5, IL-13. Estas citocinas promovem a polarização dos TAMs para o fenótipo M2. As respostas Th2 inibem a atividade citotóxica eficaz mediada pelas Th1, facilitando a evasão imunitária do tumor. a sua presença está associada mau prognóstico em cancro mamã e colorretal (217–220)



### **Figura 35-Papel funcional dos Th2 (219)**

Os **Tregs**, identificadas pela expressão do fator de transcrição FoxP3, desempenham um papel imunossupressor crucial no TME. Suprimem a atividade das células T efectoras por meio de mecanismos como a secreção de IL-10 e TGF- $\beta$  (221). As quimiocinas derivadas do tumor, como a CCL22, recrutam Tregs para o TME, aumentando a sua concentração local, amplificando a sua capacidade imunossupressora. (217,218,220).

As adaptações metabólicas características do TME, como a absorção de lípidos, permitem a sobrevivência e funcionalidade das Tregs no TME, mesmo sob condições de restrição nutricional, garantindo a sua eficácia imunossupressora (220)

### **Células Dendríticas**

As células dendríticas (DCs) no TME apresentam fenótipos e estados funcionais distintos influenciados pelo meio imunossupressor do tumor (222)

As DCs convencionais (cDCs), incluindo os subconjuntos cDC1s e cDC2, são cruciais para a apresentação de antígenos e ativação das células T, com cDC1s especializadas na apresentação cruzada para células T CD8+ e associadas a melhores resultados imunoterapêuticos (222)

As cDC2s atuam principalmente na modulação de respostas de células T CD4+.

Já as DCs plasmocitóides (pDCs), conhecidas pela secreção de interferão tipo I, são altamente plásticas, podendo induzir imunidade antitumoral ou, sob influência de citocinas como o TGF- $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , adotar um perfil de tolerância, promovendo a expansão de Tregs. A interação entre DCs, células tumorais e infiltrados imunes, limita a sua maturação e favorece a evasão imunológica tumoral.

Existe investigação em curso para estratégias terapêuticas baseadas na reprogramação funcional das DCs. (222–224).

### **4.2.3 Células endoteliais**

As células endoteliais desempenham um papel essencial na angiogênese tumoral, induzidas por fatores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) secretados por células tumorais no TME e responsável pela promoção da formação de novos vasos sanguíneos. Estas células apresentam um metabolismo e expressão genética alteradas(225).

Esta angiogênese patológica ocorre em condições persistentes e desreguladas, como no cancro, na inflamação crônica e na retinopatia diabética, em que o excesso de sinais pró-angiogênicos ultrapassa os mecanismos reguladores.

Este processo gera uma vasculatura anômala, com células disfuncionais, organização desordenada, permeabilidade elevada, facilitando a progressão tumoral, metástases e evasão imunitária(226,227). A falta de junções estreitas entre as células endoteliais potencia a troca de vários fatores de crescimento, citocinas e metabolitos que apoiam a sobrevivência e o crescimento do tumor, tornando-as também responsáveis pelo ambiente imunossupressor (225)

O TME estimula a angiogênese ativando células como os CAFs a segregarem VEGF e o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)(147,167,228), TAMs do tipo M2, a segregarem altos níveis de VEGF, FGF e metaloproteínas de matriz (MMPS), que degradam a matriz extracelular, facilitando a migração de células endoteliais e a formação de vasos sanguíneos (229)

Outras células imunitárias como as células **Tregs** secretam citocinas angiogênicas e modelam a resposta imunitária facilitando ainda mais a angiogênese tumoral(230) .

A hipóxia e o fator induzido pela hipóxia (HIFs)- em especial o HIF- $\alpha$  amplificam o desequilíbrio pró-angiogênico, criando um ciclo contínuo de formação vascular aberrante (15)

Este processo contrasta com a angiogênese fisiológica, que conta com suporte maduro de perícitos, o que resulta em vasos estáveis e funcionais (231)

Terapias que visam o VEGF ou a angiogênese tentam normalizar a vasculatura para melhorar a administração de fármacos e reduzir o potencial metastático dos tumores, contudo encontram resistências devido a mecanismos compensatórios no TME (231,232)

### **Perícitos**

Os perícitos são células perivasculares (células musculares lisas murais ou vasculares) com um núcleo proeminente e pequeno conteúdo de citoplasma, envolvem os capilares sanguíneos.

Comunicam com as células endoteliais diretamente através da membrana basal e estão sujeitos á sinalização parácrina recíproca. São assim interdependentes das células endoteliais.

Defeitos nas células endoteliais ou nos perícitos afetam o sistema vascular.

São responsáveis pela estabilização e regulação homeostática dos vasos sanguíneos maduros e facilitam a maturação dos vasos neoformados.

Nos tumores, os perícitos são menos abundantes e mais frouxamente ligados aos vasos sanguíneos do que nos tecidos normais, ainda assim, auxiliam a integridade e funcionamento da vasculatura tumoral (231,232)

## **4.3 Componentes não celulares do Microambiente Tumoral**

### **4.3.1 A matriz extracelular**

A matriz extracelular (ECM) é uma rede complexa e dinâmica de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacáridos que fornece apoio estrutural e bioquímico ás células

circundantes. É essencial para regular o comportamento celular, a organização dos tecidos e a transdução de sinais.

No TME a matriz extracelular (ECM) é constituída e enriquecida com moléculas estruturais e de sinalização específicas tais como colagénios, fibronectinas, lamininas, proteoglicanos e glucosaminas (GAGs), Tenascin-C, Metaloproteínas da matriz (MMPS), fatores de crescimento e citocinas, que criam um ambiente propício e dinâmico ao crescimento, invasão e metástase do tumor.(233–235)

Os colagénios (tipos I, III e IV) são abundantes no TME. O colagénio tipo I aumenta a rigidez da ECM e facilita a invasão tumoral enquanto o tipo IV apoia a adesão e migração celular. A Fibronectina, altamente expressa no TME, promove a adesão, migração e sobrevivência celular ao interagir com integrinas. Lamininas aumentam a adesão e a metástase, enquanto proteoglicanos e glicosaminoglicanos (por exemplo, ácido hialurónico, sulfato de heparano) hidratam a ECM e armazenam fatores de crescimento que impulsionam a progressão tumoral. A tenascina-C favorece a adesão, a migração e a modulação imunitária. As Metaloproteínas (MMPS) degradam a ECM, promovendo a invasão e libertando fatores que estimulam o crescimento e a angiogénese. Fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  e o VEGF induzem a angiogénese e a supressão imunitária (236).

Ao conjunto completo de proteínas da matriz extracelular, incluindo os principais componentes da ECM (colagénios, elastinas), proteínas associadas, glicoproteínas adesivas (lamininas, fibronectinas), proteoglicanos moléculas de sinalização, enzimas reguladoras, denomina-se matrissoma. Este mantém a integridade estrutural da ECM e modula processos celulares como a migração, adesão e diferenciação (237,238)

No TME, o matrissoma interage dinamicamente com as células cancerígenas, as células estromais, onde se incluem os fibroblastos, células imunitárias e células endoteliais. Esta interação tem impacto na progressão do tumor, nas metástases e na resposta às terapias nomeadamente desempenhando 4 principais funções,( Fig.36):

**-Suporte estrutural e função de barreira-** o matrissoma constitui o suporte físico para as células tumorais, permite ou restringe o seu movimento, a sua rigidez ou degradação facilita ou inibe a invasão do cancro;(239,240)

**-Modulação das vias de sinalização-** os componentes do matrissoma, como as fibronectinas e as lamininas interagem com os recetores (como as integrinas) das células cancerígenas e

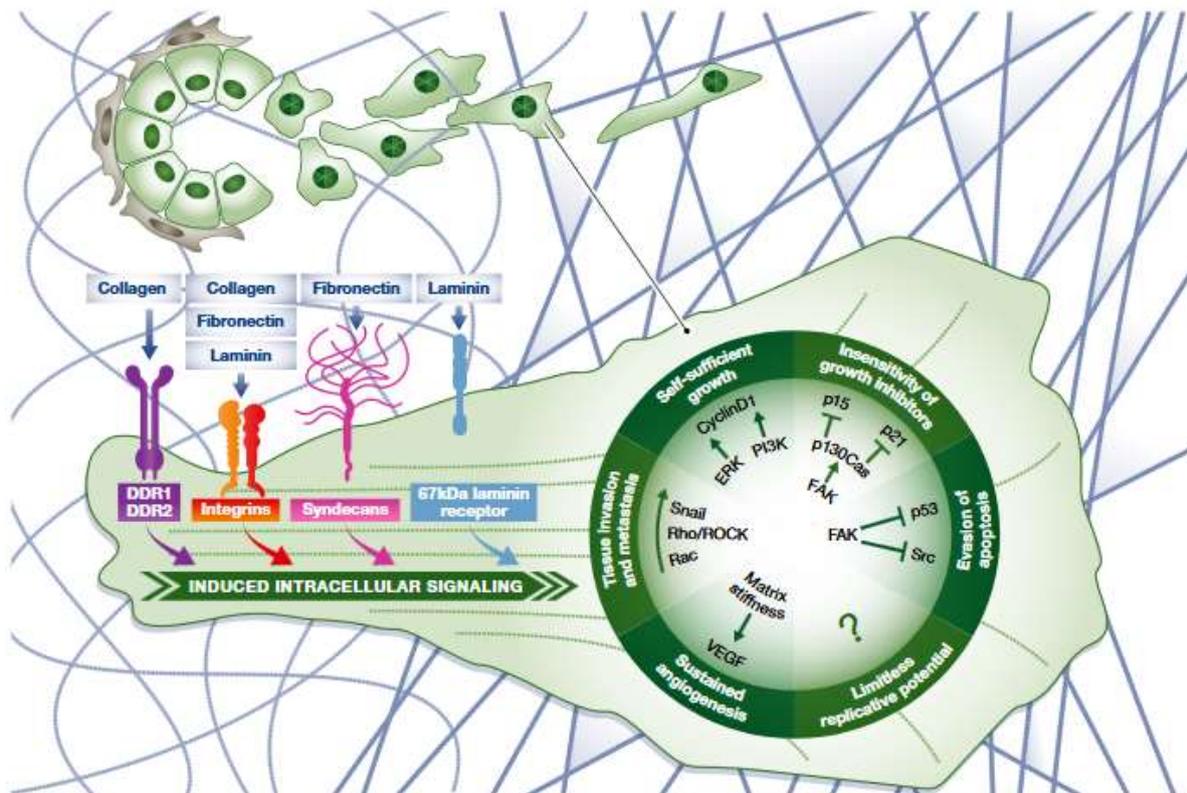
estromais ativando vias que regulam a proliferação, sobrevivência, migração de células e auxiliam ao crescimento tumoral (241,242)

**-Modulação imunitária-** certas proteínas do matrissoma atraem ou repelem células imunitárias, o que pode reforçar ou suprimir a resposta imunitária contra o tumor.

**Angiogênese:** os elementos do matrissoma regulam a formação de novos vasos sanguíneos através da ligação de fatores de crescimento que promovem ou inibem a angiogênese, fornecendo ao tumor os seus nutrientes (180,233,237,243)

As principais características diferenciadoras da ECM alterada observada no TME são:

**Aumento da rigidez e da densidade** – A ECM no TME é mais densa e rígida devido á deposição e reticulação anormal de colagénio. Esta ECM rígida promove a proliferação e invasão das células tumorais através do reforço das vias de sinalização mecânicas (34,233,244,245) ;



**Figure 1. Influences of ECM on the hallmarks of cancer.**  
 From tumor initiation to metastasis, the ECM influences each of the classically defined and emerging hallmarks of cancer as first described by Hanahan and Weinberg in 2000 and amended in 2011. ECM molecules bind to cell surface receptors, which activates intracellular signaling pathways. ECM adhesion-induced signals through ERK and PI3K promote self-sufficient growth [22]. FAK signaling inhibits growth suppressors p15 and p21 and limits the induction of apoptosis through p53 [42]. ECM components and biophysical properties promote EMT induction and enhance pro-migratory pathways, particularly TGF- $\beta$  and rho/Rac signaling [96]. ECM stiffness also enhances angiogenesis and increases VEGF signaling in endothelial cells [78]. At each phase of tumorigenesis, the ECM adapts to reinforce the progression of the disease through promotion of the hallmarks.

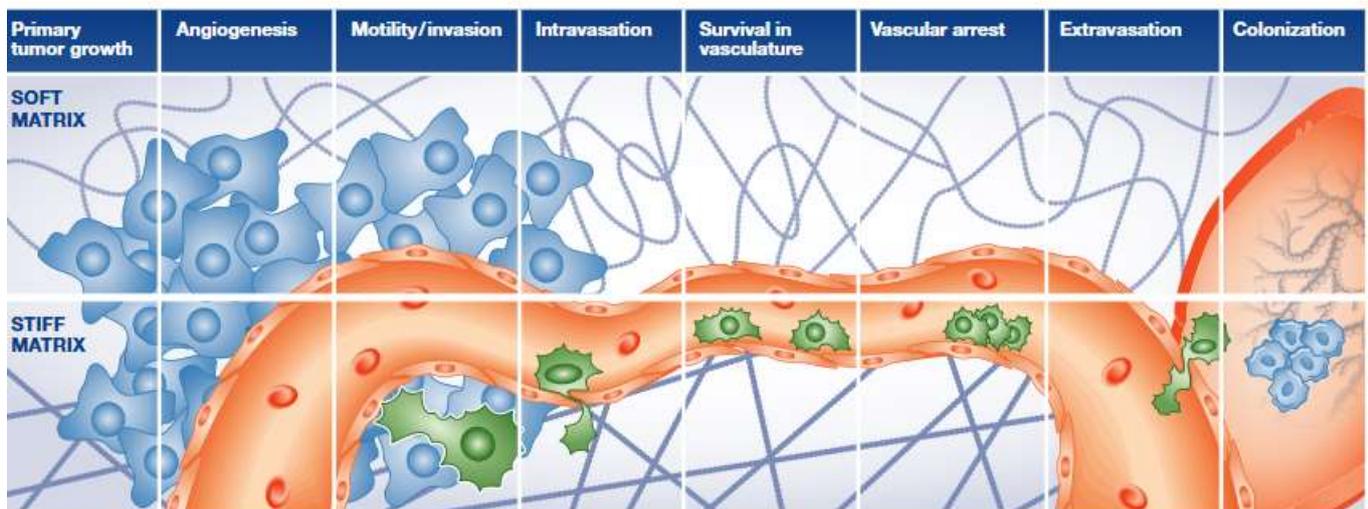
**Figura 36-Influencia da ECM nas Hallmarks of cancer** (34)

**-Composição alterada:** - A ECM-TME tem uma maior abundância de determinadas proteínas (colagénios (I, II, III, IV) fibronectinas e proteoglicanos específicos, que interagem com as células cancerígenas e promovem fenótipos agressivos(233,246,247).

**-Remodelação reforçada da ECM-**A remodelação reforçada da ECM ocorre quando as células tumorais e estromais, como as CAF, libertam níveis elevados de metaloproteínas da matriz, levando a uma degradação excessiva da matriz.

Este processo promove a migração e a invasão das células cancerígenas através da ativação de vias de sinalização. A remodelação da ECM provocada por enzimas proteolíticas como as MMPs e as serino-protéases, permite a adaptação dos tecidos, a reparação e a migração celular. No TME, a remodelação acelera para apoiar o crescimento e a metástase do tumor, facilitando a comunicação intercelular e libertando moléculas bioativas que estimulam a sinalização celular, a angiogénese e a inflamação, (Fig.37).

As integrinas e os recetores como o CD44 promovem ainda mais as interações célula-ECM, reforçando a progressão do cancro (248,249)



**Figure 3. Influences of ECM on the metastatic cascade.**

Tumor cell dissemination and establishment of metastatic lesions are controlled by several stringent processes that include induction of an invasive phenotype, migration through the tissue parenchyma, intravasation into the bloodstream, survival in the circulation, followed by extravasation and growth and survival at a secondary organ site. Adhesion to the ECM regulates each of these stages of tumor metastasis.

**Figura 37-Influencia da ECM na cascada proliferativa (249)**

**Sinalização pro-tumorigênica-** A ECM liga-se a fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas de sinalização de forma a ativar vias que apoiam o crescimento do tumor, a angiogénese e a evasão imunitária.

**Modulação imunitária-** A matriz do TME pode atuar como barreira física e bioquímica que restringe a infiltração das células imunitárias e suporta um ambiente imunossupressor através da secreção de componentes da matriz que inibem as células imunitárias, (Fig.38).

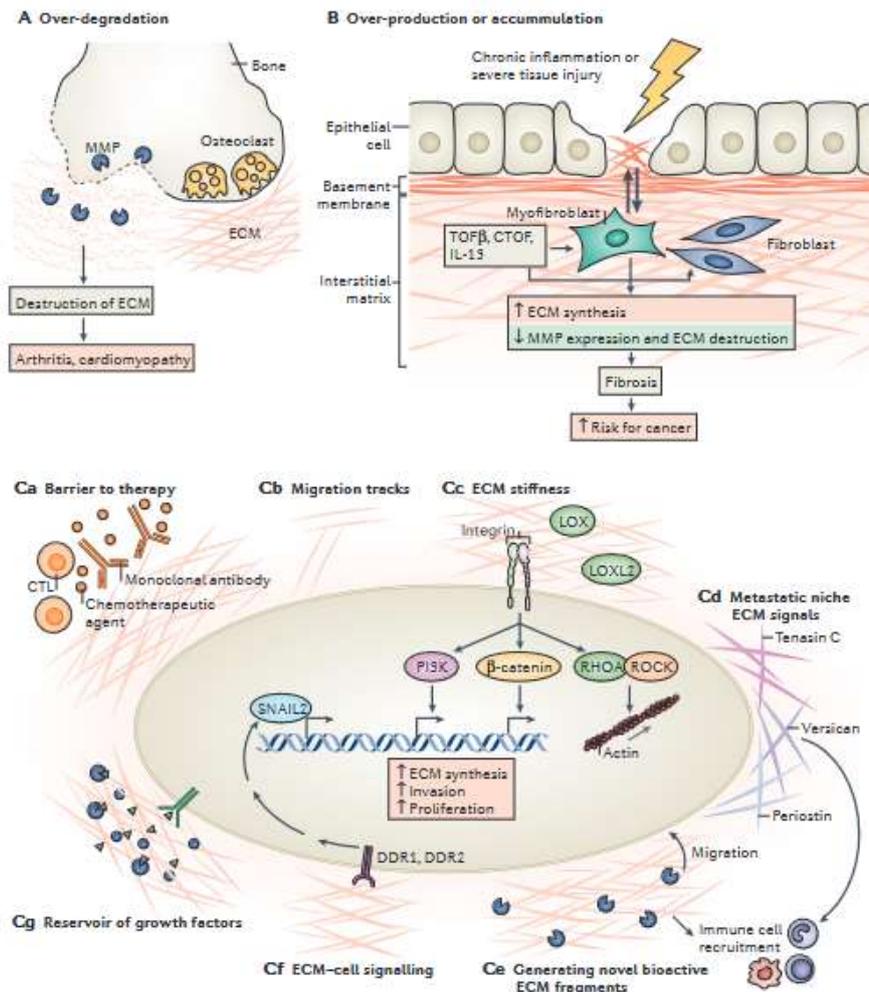


Figure 4 | Aberrant extracellular matrix remodelling leads to numerous human diseases. A | Over-degradation of the extracellular matrix (ECM), mediated primarily by matrix metalloproteinases (MMPs) and ADAMTS (ADAMs with a thrombospondin motif), results in osteoarthritis and increased breakdown of the connective tissue. B | As a result of chronic inflammation or tissue injury, transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), connective tissue growth factor (CTGF), interleukin-13 (IL-13) and other factors stimulate fibroblasts and myofibroblasts (the main ECM producers) to produce more ECM, resulting in pathological fibrosis. The excess ECM further stimulates fibroblasts to continue making ECM, forming a positive feedback loop. Fibrosis is a major risk factor for developing cancer, including hepatocellular carcinoma and breast cancer. C | The ECM contributes to cancer pathogenesis by several mechanisms: functioning as a barrier to chemotherapy, to monoclonal antibodies such as cetuximab and to immune therapy mediated, for example, by cytotoxic T cells (CTLs) (part Ca); forming migration track 'highways' that regulate the interaction of immune cells with cancer cells (part Cb); stimulating integrin signalling through increased ECM stiffness, which promotes ECM synthesis, invasion and proliferation (lysoyl oxidase (LOX) and LOX-like 2 (LOXL2) are enzymes that crosslink collagen and are the main enzymes responsible for increasing ECM stiffness) (part Cc); forming a niche for new metastatic cells and providing survival and proliferative signals (part Cd); generating novel bioactive ECM fragments from native ECM chains, and stimulating cell migration or immune cell recruitment (part Ce); activating cell-ECM receptors such as discoidin domain-containing receptor 1 (DDR1) and DDR2, which bind directly to collagen and regulate transcriptional pathways to increase MMP and epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker expression (part Cf); and sequestering growth factors that can be released by proteolytic cleavage, which then diffuse to bind receptors to stimulate cell growth, EMT or angiogenesis (part Cg).

**Figura 38-A ECM aberrante influencia numerosas doenças (249)**

### 4.3.2 Citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas

As citocinas desempenham papéis centrais na progressão tumoral, modulando, diferentes etapas do desenvolvimento do cancro.

No TME, influenciam a resposta imune, Fig.39, de forma dual podendo promover a progressão do tumor ou a sua supressão por de vias de sinalização complexas.

As citocinas pró-inflamatórias como o interferão-gama ( $IFN\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral ( $TNF\alpha$ ) favorecem a atividade das células  $TCD8+$  e potencializam as respostas anti tumorais, ao modificar o TME aumentando a infiltração e ativação de células imunitárias(250). Inversamente, citocinas imunossupressoras como a interleucina-10(IL-10) e o fator de crescimento transformador- $\beta$  ( $TGF-\beta$ ) criam um ambiente imunossupressor ao recrutar células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas das mieloides, facilitando a evasão imunitária por parte das células cancerígenas. Este papel paradoxal depende do tipo de citocina, da concentração e do contexto do TME.(251,252)

Enumera-se seguidamente as citocinas mais impactantes nas diferentes etapas da carcinogénese:

#### **Iniciação**

A  $IL-1\beta$ , produzida por CAFs, TAMs, monócitos, DCs, entre outras, promove a inflamação e os danos nos tecidos, enquanto o  $TNF\alpha$ , secretado por TILs e CAFs, induz a apoptose e a inflamação, contribuindo para a iniciação do tumor.(252)

#### **Elongação**

A  $IL-6$ , produzida por CAFs e células supressoras derivadas de mieloides, entre outras, promove o crescimento tumoral e a angiogénese, estimulando a proliferação de células cancerígenas e endoteliais (252)

O  $TGF-\beta$ , secretado pelas células cancerígenas e estromais entre outras, promove a transição epitelial-mesenquimal, a imunossupressão e a remodelação dos tecidos, apoiando o crescimento e a invasão do tumor (252)

#### **Progressão:**

A  $IL-8$ , produzida por células cancerígenas e estromais, células vasculares, entre outras, atrai células imunitárias e promove a angiogénese, auxiliando o crescimento e a invasão do tumor.



## Quimiocinas

As quimiocinas e as citocinas trabalham sinergeticamente no TME, Fig.39-40, enquanto as citocinas regulam amplamente as respostas imunitárias, as quimiocinas fornecem pistas espaciais que orquestram onde e como as células imunitárias se envolvem no TME. Exemplo disto são o CCL2 o CXCL12 que recrutam monócitos e células supressoras derivadas dos mieloides promovendo um ambiente imunossupressor que ajuda o crescimento do tumor, (Fig.40) (256,257).

Os ligandos CXCL9 e o CXCL10 ajudam a direcionar as células T efetoras para o tumor, promovendo a imunidade antitumoral especialmente em tumores inflamados. A interação entre as quimiocinas e as citocinas é complexa e dependente do contexto; desempenha um papel fundamental na definição da imunogenicidade do TME e no impacto dos resultados da imunoterapia (253,258)

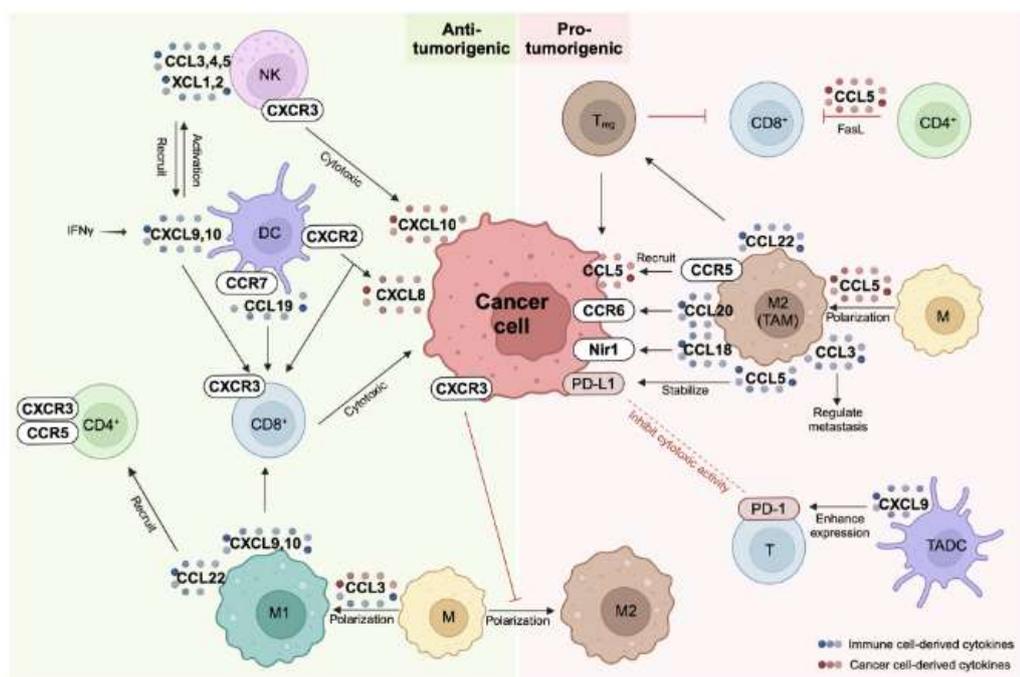
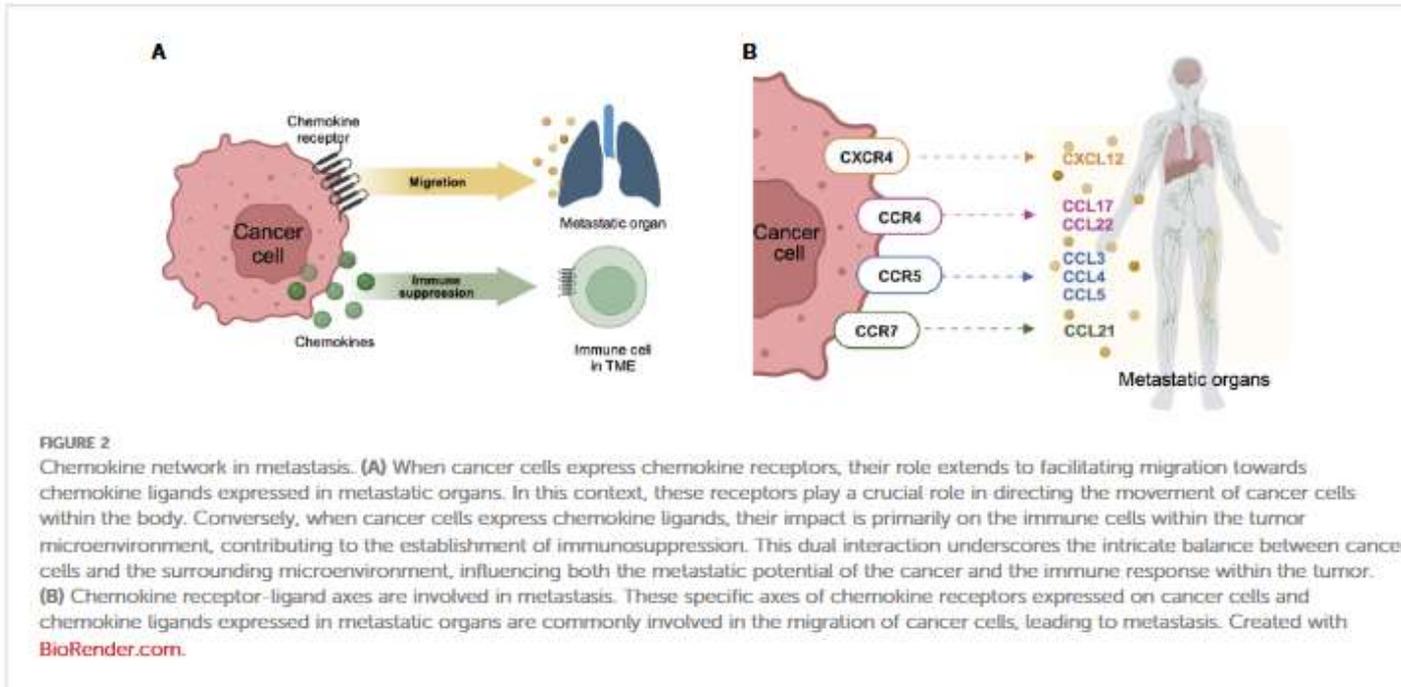


FIGURE 1

Chemokine network between immune cells and cancer cells. Chemokine receptors (CCR or CXCR) and their ligands (CCL or CXCL) are expressed on cancer cells and a variety of immune cells including natural killer (NK) cells, dendritic cells (DC), macrophages (M), and T cells. The same chemokine can exhibit either anti-tumorigenic or pro-tumorigenic properties depending on the specific cell type it interacts with. For instance, macrophages display anti-tumorigenic characteristics when polarized to M1 and pro-tumorigenic attributes when polarized to M2. NK cells and CD8+ T cells contribute to cancer cell elimination through cytotoxic actions, representing pivotal players in the immune response against tumors. On the other hand, PD-1/PD-L1 interactions occurring between cancer cells and T cells serve to suppress T cell activity, contributing to immune evasion. Additionally, regulatory T (Treg) cells, tumor-associated dendritic cells (TADC), and M2 macrophages collectively contribute to the establishment of an immunosuppressive environment within the tumor microenvironment. These intricacies highlight the complex interplay between various immune cell types and the tumor cells in shaping the dynamics of cancer progression and response to immunotherapy. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

**Figura 40-Interação celular- as Quimiocinas (253)**

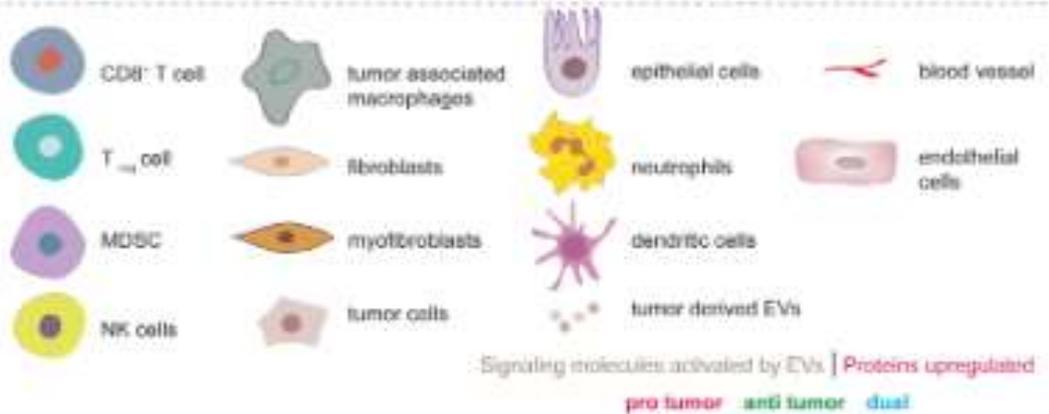
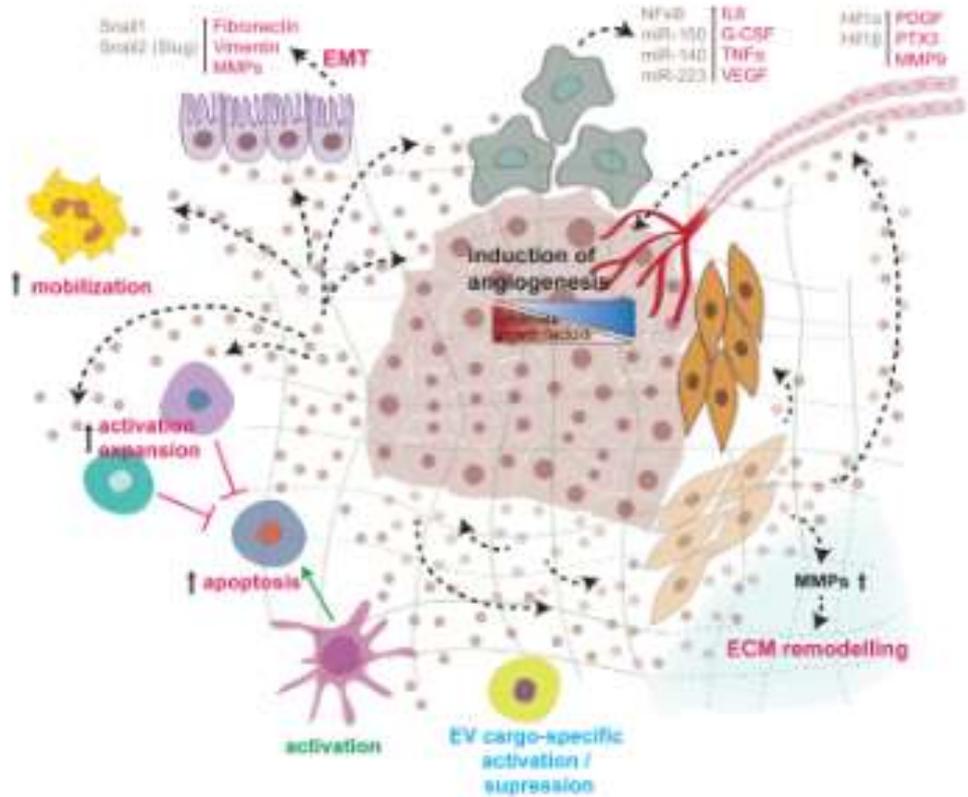


**Figura 41-Quimiocinas e metastização (253)**

### Exosomas e microvesículas

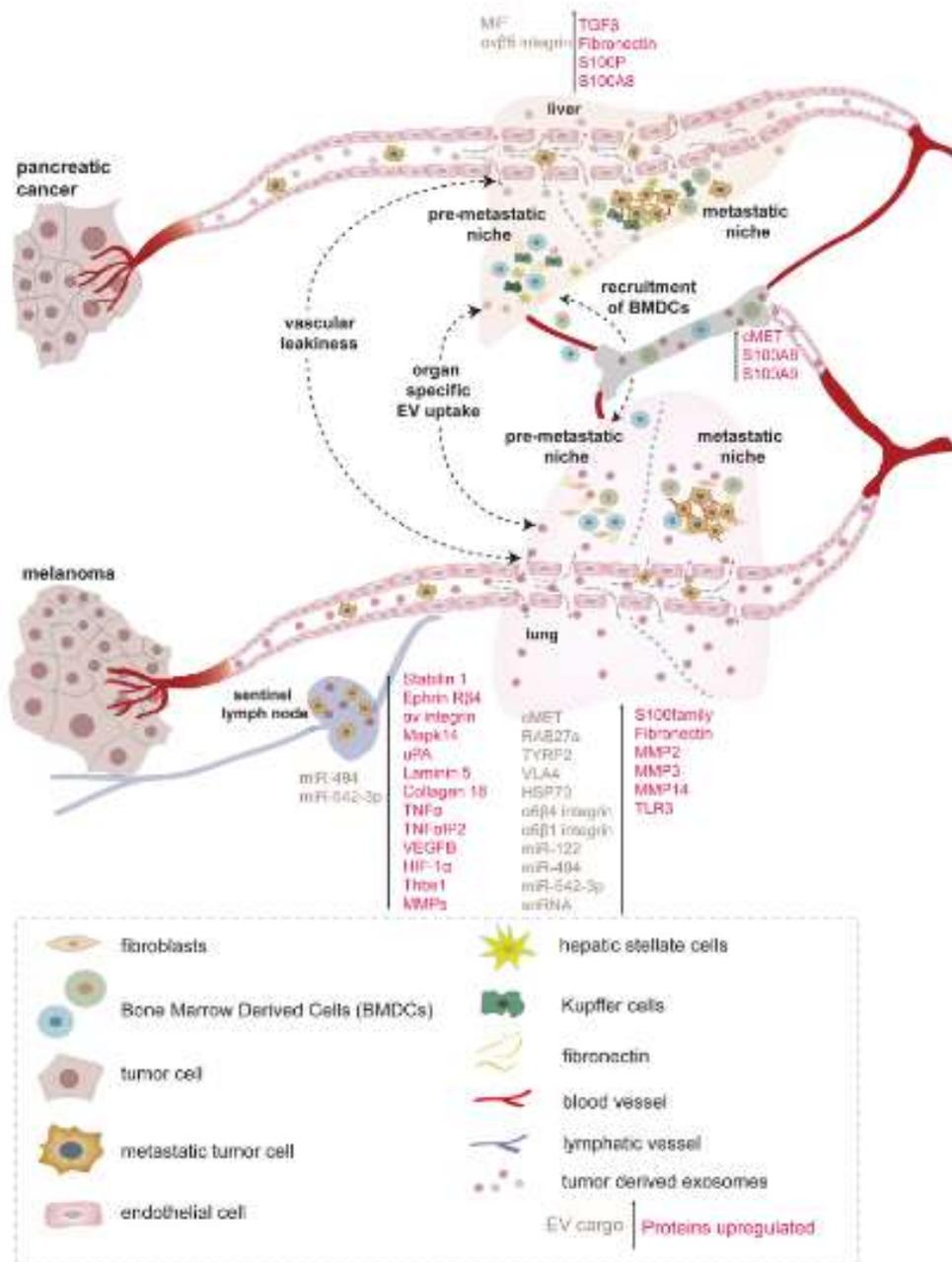
Exosomas e vesículas extracelulares transportam biomoléculas contendo RNA, DNA, proteínas, lípidos estão envolvidas na transferência de fatores oncogénicos, (Fig.42-43), entre células dentro do TME, podendo remodelar a ECM, e promover a metastização (259,260).

As exovesículas podem melhorar a comunicação celular e desempenhar um papel na resistência aos medicamentos (259–263).



**Figure 1. Role of tumor-derived EVs on the primary tumor microenvironment**  
 Tumor EVs cause fibroblasts to differentiate into myofibroblasts, which release MMPs and lead to extracellular matrix remodeling. The breakdown of ECM leads to the release of growth factors embedded in the ECM and promotes invasion through parenchymal cells. Tumor EVs activate tumor-associated macrophages to secrete G-CSF, VEGF, IL-6, and TNF $\alpha$ , which together promote angiogenesis and create an inflammatory niche. Tumor EVs affect immune system homeostasis mostly by triggering immunosuppressive changes that protect the tumor. Tumor EVs activate and expand T<sub>reg</sub> and MDSCs, which inhibit CD8<sup>+</sup> T-

*Figura 42-Papel das exovesículas derivadas do tumor no TME (260)*



**Figure 2. Tumor-derived EVs promote pre-metastatic niche formation and metastasis**  
 EVs play a distinct role at multiple steps in PMN formation at distant sites of future metastasis. Depending on the cancer cell of origin, EVs can circulate through both blood and lymphatic vessels to reach their destination for PMN initiation. Through an unknown mechanism, tumor EVs can induce vascular leakiness and interact with the resident cells of distant organs. Depending on their membrane composition, such as specific exosomal integrin combinations (exosomal  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 and  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 integrins associated with lung metastasis / exosomal  $\alpha$ 7 $\beta$ 5 integrin with liver metastasis), EVs are targeted to particular resident cell

*Figura 43-As exovesículas tumorais e o seu papel na metastização (260)*

## 4.4 Hipóxia e reprogramação metabólica

A hipóxia é característica dos tumores sólidos, surge devido à rápida proliferação celular, que excede a capacidade de vascularização(264), criando regiões com baixos níveis de oxigênio no TME,( Fig.44).

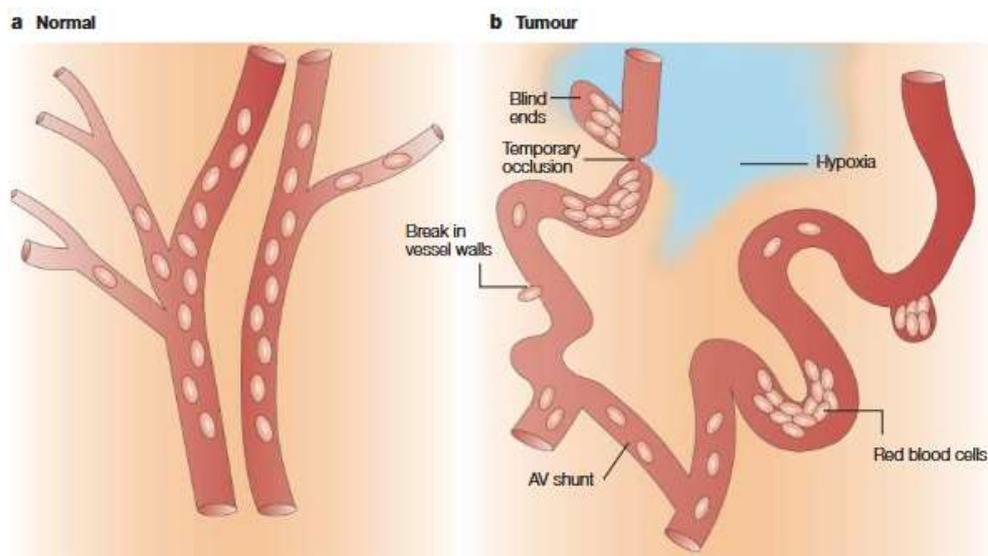


Figure 1 | **The vascular network of normal tissue versus tumour tissue.** Tumours contain regions of hypoxia and necrosis because their vasculature can not supply oxygen and other vital nutrients to all the cells. Whereas normal vasculature (a) is hierarchically organized, with vessels that are sufficiently close to ensure adequate nutrient and oxygen supply to all cells, tumour vessels (b) are chaotic, dilated, tortuous and are often far apart and have sluggish blood flow. As a consequence, areas of hypoxia and necrosis often develop distant from blood vessels. In addition to these regions of chronic (or diffusion-limited) hypoxia, areas of acute (or perfusion-limited) hypoxia can develop in tumours as a result of the temporary closure or reduced flow in certain vessels. Adapted from REF: 125. AV, arteriovenous.

### Figura 44-Rede vascular nos tecidos normais versus tecidos tumorais (264)

Essa condição ativa fatores induzidos pela hipóxia (**HIFs**) particularmente o **HIF- $\alpha$** ; que regulam genes associados à angiogénese e á sobrevivência celular promovendo o crescimento tumoral (265)

Além disso, a hipóxia remodela o TME, favorecendo a imunossupressão, por meio do recrutamento **Tregs** e células T supressoras derivadas dos mielóides (**MDSCs**) que reforçam a progressão e a metastização do tumor (266).

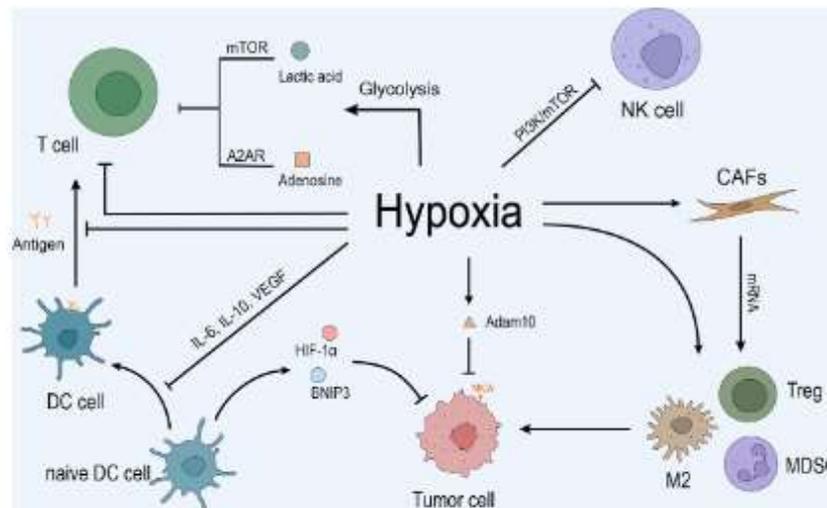
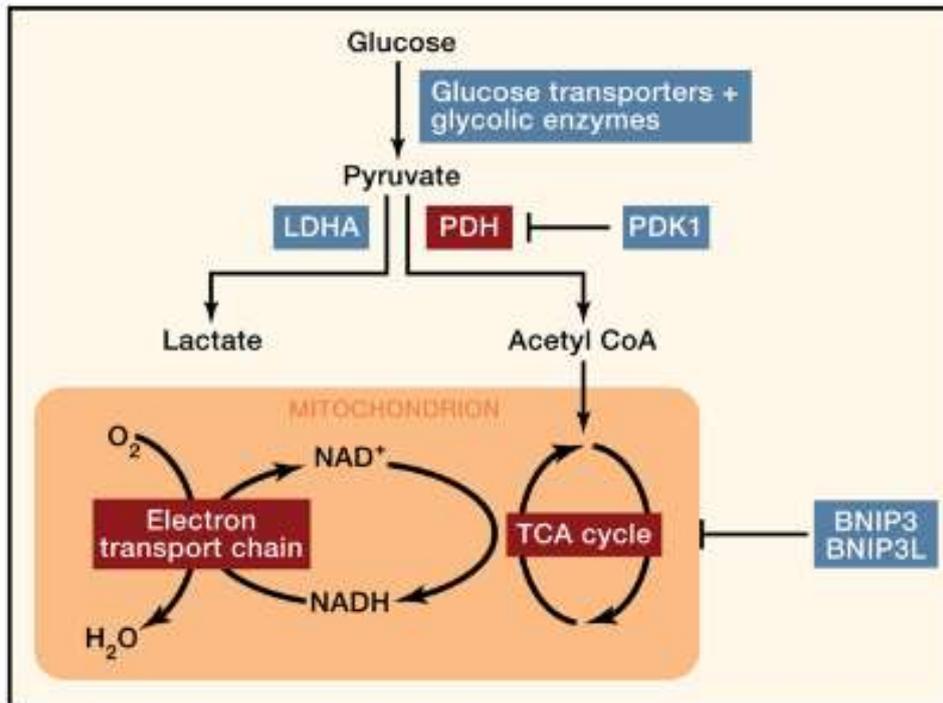


FIGURE 1

Hypoxia inhibits the immune response by inhibiting immune cells, recruiting immunosuppressive cells, regulating CAFs, promoting tumor cell growth, and mediating immune escape. (A) Anoxic metabolites, lactic acid, and adenosine inhibit T cell effector function and proliferation by blocking the mTOR pathway and interacting with the A2A receptor on the T cell surface. Hypoxia promotes T cell apoptosis and directly inhibits T cell proliferation and differentiation. Hypoxia upregulates IL-10, VEGF, and other cytokines through HIF-1 $\alpha$  and inhibits the differentiation and maturation of DCs, leading to the inhibition of T cell function. Moreover, hypoxia-induced high levels of HIF-1 $\alpha$  and BNIP3 promote programmed cell death in tumor cells captured by DC. In addition, hypoxia inhibits NK cell function by activating the PI3K/mTOR signaling pathway. (B) Hypoxia induced the mRNA expression of TGF- $\beta$ , VEGF, IL-6, IL-10, and PD-L1 and promoted CAF participation in the recruitment of MDSCs, Tregs, and type 2 TAMs to maintain the immunosuppressive state of the microenvironment, promoting tumor cells to evade immune surveillance. (C) Hypoxia upregulates the expression of MMP adam10 and induces the immune escape of tumor cells.

### Figura 45-Hipóxia inibe a resposta imunitária no TME (266)

A hipóxia impulsiona também, a reprogramação metabólica dentro das células tumorais caracterizada pelo “efeito de Warburg” - um desvio da fosforilação oxidativa para a glicólise aeróbica, com aumento da produção de lactato mesmo na presença do oxigênio, (Fig.46), isto fornece ATP de forma rápida e sustenta vias bio sintéticas essenciais à proliferação celular (266,267)



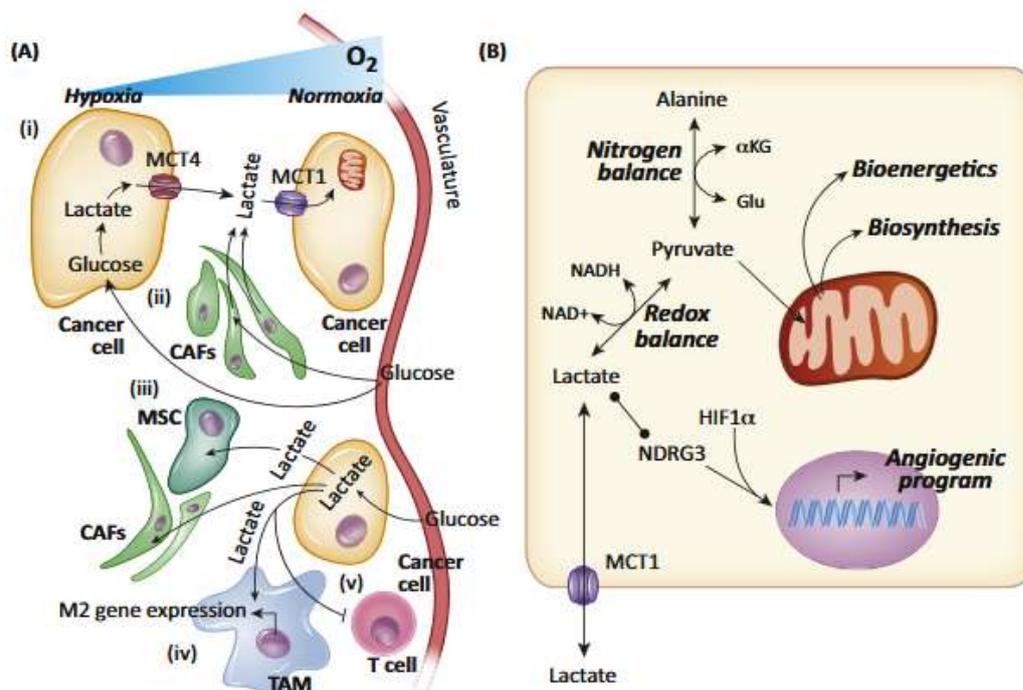
**Figure 1. Regulation of Glucose Metabolism**

Under hypoxic conditions, hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) activates the transcription of genes encoding the following: glucose transporters and glycolytic enzymes, which increase the flux of glucose to pyruvate; PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase), which inactivates PDH (pyruvate dehydrogenase), the mitochondrial enzyme that converts pyruvate to acetyl CoA for entry into the tricarboxylic acid (TCA/citric acid/Krebs) cycle; LDHA (lactate dehydrogenase), which converts pyruvate to lactate; and the mitochondrial proteins BNIP3 and BNIP3L, which induce mitochondrial-selective autophagy. The shunting of substrate away from the mitochondria reduces ATP production but prevents excess ROS production that occurs due to inefficient electron transport under hypoxic conditions.

**Figura 46-Regulação do metabolismo da glucose sob condições de hipóxia (265)**

Esta reprogramação contribui para a acidez do TME, inibindo funções imunes e promovendo a expansão de células imunossupressoras como macrófagos M2, (Fig. 46-48), (265,266,268–270).

A hipoxia, a modulação do TME e a reprogramação metabólica atuam sinergeticamente com cada componente a reforçar os outros, criando-se um ambiente propício à persistência e disseminação tumoral.(266–273)



Trends in Cell Biology

**Figure 2. The Multifaceted Roles of Lactate in Tumor Metabolism.** (A) Cross-feeding and crosstalk mechanisms. Glucose-derived lactate has been reported to (i) originate in hypoxic cancer cells and feed cancer cells within the same tumor that are in proximity to the vasculature; (ii) originate in cancer-associated fibroblasts (CAFs) and feed cancer cells; (iii) originate in cancer cells and feed mesenchymal stem cells (MSCs) and CAFs; (iv) polarize macrophages toward an alternatively polarized M2/tumor-associated macrophage (TAM) fate; and (v) inhibit antitumor T cells. Lactate is released through the MCT4 transporter and taken-in by the MCT1 transporter. (B) Intracellular metabolic and signaling functions. Metabolism of intracellular lactate regulates nitrogen and redox balance, bioenergetics, and biosynthesis. In addition, lactate can participate in signaling via direct binding to N-myc downstream-regulated gene 3 (NDRG3) and activation of a hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )-dependent angiogenic program. Abbreviations:  $\alpha$ KG, alpha-ketoglutarate; Glu, glutamate; MCT, monocarboxylate transporter; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide oxidized; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide reduced.

### Figura 47-Efeito da hipóxia no metabolismo do TME- o papel do lactato (268)

Alterações metabólicas, (Fig.47), não só aceleram o crescimento do tumor como também aumentam a resistência á terapia, já que as células hipóxicas são menos suscetíveis à radiação e á quimioterapia, dependentes do oxigénio para gerar espécies reativas de oxigénio (ROS) que danificam as células cancerígenas (264).

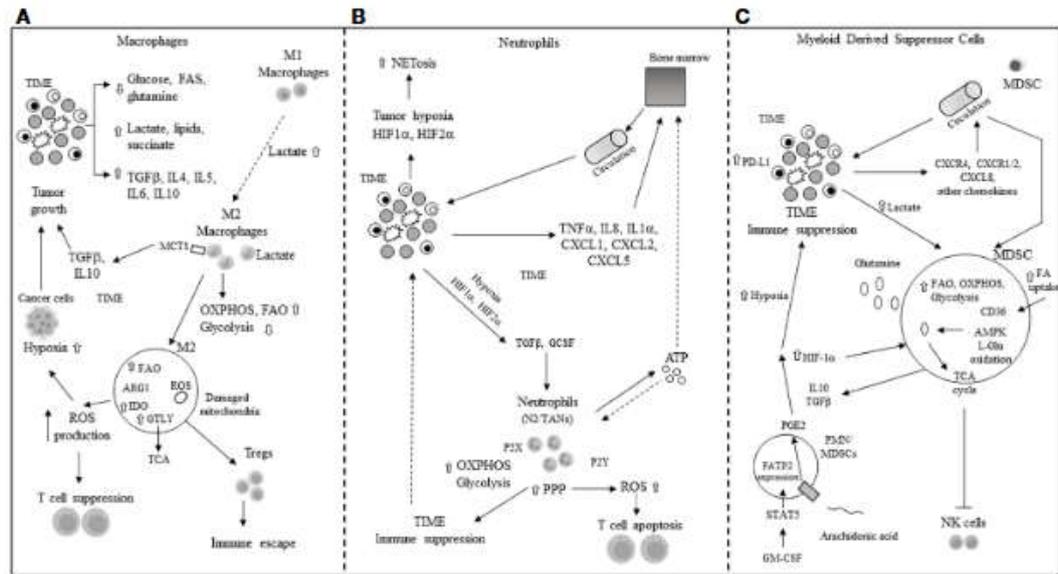


FIGURE 3

Main mechanisms of immune escape in tumor immune microenvironment (TIME) through metabolic reprogramming in macrophages, neutrophils and myeloid derived suppressor cells. **(A)** M1, M2: macrophage type 1 and type 2 phenotype; TGF $\beta$ : tumor growth factor beta; IL: interleukin; FAs: fatty acids; MCT1: monocarboxylic transporter 1; OXPHOS: oxidative phosphorylation; FAO: fatty acid oxidation; ROS: reactive oxygen species; Tregs: T regulatory cells; IDO: indoleamine 2,3 dioxygenase; ARG: arginase; GTLY: glutaminolysis. **(B)** NETosis: neutrophils extracellular transactivation and release; TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha; ATP: adenosin triphosphate; CXCL: chemokine ligand; PPP: pentose phosphate pathway; P2X, P2Y: purinergic receptors; N2: neutrophil type 2; TANs: tumor-associated neutrophils; OXPHOS and ROS: see panel A. **(C)** MDSC: myeloid derived suppressor cell; HIF-1 $\alpha$ : hypoxia inducible factor 1 alpha; CXCR: chemokine receptor; AMPK: 5' adenosine monophosphate activated protein kinase; L-Glu: L-glutamine; CD36: cluster of differentiation 36; TCA: tricarboxylic acid; PGE2: prostaglandin E2; NK: natural killer; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor; STAT5: signal transducer and activator of transcription 5; FATP2: fatty acid transport protein 2; CXCL: see panel B; FAO: see panel A;  $\uparrow$ : increase;  $\downarrow$ : decrease.

## Figura 48-Mecanismos de evasão imunitária em microambientes de hipóxia(269)

O estudo destas vias de sinalização, (Fig.48), pode fornecer informações sobre potenciais alvo terapêuticos.

## 4.5 Evasão imunitária e Imunoterapia

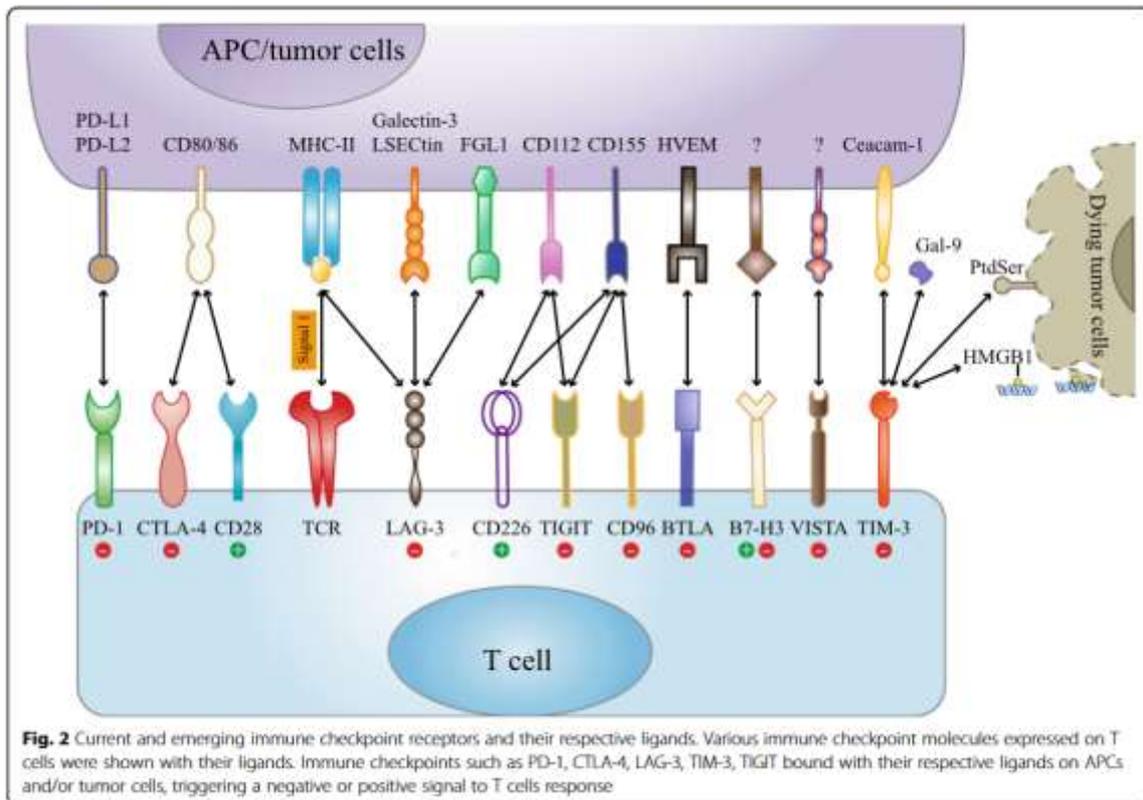
### 4.5.1 Immune Checkpoints

Os pontos de controlo imunitários são vias regulatórias, que ativam ou inibem respostas imunitárias, desempenhando um papel crucial na auto-tolerância e na prevenção da autoimunidade. São exploradas pelas células tumorais para escapar à deteção e destruição imunitária, permitindo o crescimento descontrolado e o amortecimento dos mecanismos de defesa naturais do organismo(274).

Os *checkpoints*, (Fig. 49) mais estudados são:

**Via PD-1/PD-LI:**- o recetor PD-1 nas células T liga-se ao seu ligando PD-LI , frequentemente sobre expresso nas células tumorais. Esta ligação faz com que as células T reduzam a sua atividade, permitindo ao tumor escapar às respostas imunitárias;

**Via CTLA-4** O CTLA-4, outro recetor das células T compete com o recetor estimulador CD28 pela ligação aos ligandos B7-1 e B-7-2 nas células apresentadoras de antígenos. Quando o CTLA-4 se liga, transmite um sinal inibitório à célula T, reduzindo a sua ativação.



**Figura 49-Recetores de Checkpoints e seus ligandos(275)**

Estratégias emergentes incluem o estudo de *checkpoints* adicionais como o Tim-3; Lag-3 e o TGIT que contribuem para a resistência (275–277) .

**Mecanismos de evasão imunitárias e estratégias alvo**

As células cancerígenas empregam várias estratégias evasivas, incluindo a regulação negativa da apresentação dos antígenos e a expansão de moléculas imunossupressoras no TME para criar um nicho imunossupressor(278), os tumores manipulam o TME recrutando células reguladoras e células supressoras derivadas de mielóides que inibem a vigilância imunitária eficaz permitindo o desenvolvimento tumoral(279).

Na leucemia mieloide aguda (LMA) estes mecanismos são particularmente robustos, as células leucémicas reforçam pontos de controlo imunitário e induzem a exaustão das células T, complicando eficácia terapêutica (280)

Estas adaptações evasivas realçam a necessidade das terapias combinadas que contemplem várias vias, abordagens personalizadas com a identificação de populações de doentes com maior risco de evasão imunitária e adaptação de planos de tratamento em conformidade, e o transplante de células estaminais, para reconstruir o sistema imunitário e potencialmente ultrapassar os mecanismos de evasão imunitária (278–282)

#### **4.5.2 Linfócitos infiltradores de tumor**

Os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) são células imunitárias predominantemente células T, que penetram nos tecidos tumorais e desempenham um papel fundamental na resposta a imunitária. Funcionalmente os TILs reconhecem e têm como alvos antigénios específicos do tumor apresentados na superfície das células cancerígenas. Quando as reconhecem iniciam uma resposta citotóxica destinada a eliminar essas células malignas (283,284)

As TILs são compostas por vários subgrupos de células T, onde se inclui células T CD8+ citotóxicas e células TCD4+ auxiliares, e outras células imunitárias como as células naturais Killer (NK e macrófagos. A sua presença e atividade nos tecidos tumorais são influenciadas pela imunogenicidade do tumor, o que significa que atraem mais TILs, o que se correlaciona com uma supressão tumoral imunomediada mais forte(284) nos tumores que apresentam mais antigénios mais distintos.

O papel dos TILs na imunidade antitumoral é multifacetado. As TILs CD8+ citotóxicas são as principais responsáveis pela morte direta das células cancerígenas, enquanto que as TILs CD4+ apoiam esta resposta através de secreção de citocinas que aumentam a proliferação das CD8+.(285).

Alguns subconjuntos de TILs podem recrutar outras células imunitárias para o microambiente tumoral, amplificando efetivamente a resposta imunitária do tumor.

Níveis elevados de TILs em vários tipos de cancro, incluindo melanoma, cancro da mama, cancros colorretais estão associados a um melhor prognostico dos doentes e a taxas de sobrevivência mais elevadas sublinhando a sua importância como biomarcador favorável em oncologia (285)

Os TILs são importantes na imunoterapia contra o cancro. A terapia TIL adotiva, que envolve o isolamento, a expansão e a reinfusão de TILs no doente demonstrou ser promissora no reforço da imunidade antitumoral, particularmente em doentes com Melanoma(286). Esta abordagem tira partido da especificidade das TILs em relação ao tumor, oferecendo uma estratégia imunoterapêutica personalizada com potencial para melhorar resultados em cancros resistentes aos tratamentos convencionais (286,287)

### **4.5.3 Impacto da Imunoterapia no microambiente tumoral e as suas consequências**

A imunoterapia remodela significativamente o TME, transformando-o de um espaço imunossupressor num espaço mais propício às respostas imunitárias antitumorais.

Os inibidores dos *checkpoints*, que bloqueiam vias inibitórias como o PD-1/PdDL1 e o CTLA-4, reativando as células T exauridas no TME, aumentam a atividade citotóxica contra as células cancerígenas(274) Esta reativação imunitária conduz frequentemente a um afluxo de células imunitárias, particularmente células T citotóxicas, para o TME, promovendo um ambiente hostil ao crescimento tumoral(143,274) .

A remodelação do TME pode ter consequências mistas, i.e., embora a resposta imunitária reforçada possa levar á regressão do tumor, pode também promover inflamação e eventos adversos relacionados com o sistema imunitário uma vez que os tecidos saudáveis são por vezes visados no processo (288)

Certos cancros adaptam-se à imunoterapia alterando o TME para resistir à infiltração de células imunitárias ou promover células T reguladoras, o que pode diminuir a eficácia do tratamento ao longo do tempo (289).

Os desafios desta terapêutica são complexos e obrigam a um equilíbrio entre a gestão terapêutica e a gestão dos efeitos adversos.

## **4.6 Interações estroma-tumor**

A sinalização bidirecional no TME refere-se à comunicação recíproca entre as células tumorais e as células do estroma circundante, que inclui células imunitárias, fibroblastos, células endoteliais e a matriz extracelular. Esta interação bidirecional é crucial para a progressão do tumor, uma vez, que permite que as células estromais respondam e influenciem o ambiente circundante criando um nicho de apoio ao crescimento tumoral e, à evasão imunitária e ao processo de metastização(290,291).

Por meio de vias de sinalização como o TGF- $\beta$ , PD1/PD11 e CXCL12-CXCR4 as células tumorais podem promover alterações que suprimem as respostas imunológicas ou aumentam a angiogênese, enquanto que as células estromais podem, por sua vez secretar factores que aumentam a sobrevivência das células tumorais , invasão e resistência a terapêuticas(144).

Este *crosstalk* dinâmico acaba por moldar o TME para favorecer a malignidade.

Há um potencial terapêutico a desenvolver, no direcionar terapêuticas, que tenham por objetivo, os sinais bidirecionais de modo a se interromper as interações tumor estroma e inibir a progressão do cancro (144,290,291).

#### **4.7 *Cancer Stem cells* e o microambiente tumoral**

O TME apoia as células estaminais cancerígenas (CSC) fornecendo sinais e nutrientes essenciais que mantêm as suas capacidades de autorrenovação, plasticidade e sobrevivência fundamentais para a progressão e recorrência do tumor.

Através das interações com as células estromais circundantes, células imunitárias e componentes da matriz extracelular, o TME promove um nicho que protege as CSC da detecção imunitária e aumenta a sua resistência às terapias.

As condições de hipóxia dentro do TME ativam as vias HIF-1 $\alpha$  promovendo a severidade da CSCs e regulando positivamente as vias de sobrevivência que reduzem a sensibilidade à quimioterapia (15,265,292)

A sinalização por citocinas como a Il-6 e o TGF- $\beta$  promove a transição epitelial-mesenquimal (EMT), um processo que está associado a características semelhantes às de CSC, aumentando a capacidade invasiva, o que contribui para a metástase e a resistência à terapia(293–295).

A recorrência e a resistência são frequentemente observadas conforme as CSC remanescentes, protegidas pelo nicho, repovoam o tumor e se adaptam para escapar a tratamentos subsequentes. Esta resiliência torna a interação entre o microambiente tumoral e as CSC uma abordagem promissora para reduzir a recorrência e superar a resistência terapêutica(15,293–295)

## 4.8 Implicações e terapias dirigidas ao Microambiente tumoral

### 4.8.1 Terapias correntes e emergentes

As terapias que visam o TME especificamente aos CAFs e a ECM, têm como objetivo desestabilizar as redes de suporte que favorecem a progressão tumoral. Contudo estas abordagens enfrentam desafios importantes:

A **heterogeneidade celular** de todos os componentes celulares do TME em particular nas populações de CAFs; conduzem a resultados terapêuticos inconsistentes(296)

**Efeitos adversos** das terapias dirigidas á ECM- a modulação da ECM pode prejudicar a homeostase dos tecidos normais, conduzir a toxicidade, e alterar as interações entre as células tumorais e a matriz contribuindo para a invasividade e metástase (297)

Os CAFs e a ECM possuem plasticidade adaptativa. Reconfiguram-se dinamicamente em resposta ás pressões terapêuticas ativando vias compensatórias que preservam as funções promotoras do tumor, contribuem para a resistência adaptativa e desempenham papeis duais na progressão e na supressão tumoral (298–300)

### 4.8.2 Avanços tecnológicos e metodológicos

#### 4.8.2.1 Técnicas ômicas

A ómica espacial, como a transcriptômica e a proteômica espaciais permitem a investigação da estrutura tecidual enquanto se mapeia dados moleculares, o que é essencial à compreensão das interações celulares no TME(301,302). Estas técnicas mostram o mapeamento preciso das distribuições de proteínas e RNA no TME. São exemplo, as tecnologias *Dbit-seq* e *Transcriptômica espacial de alta definição* (HDST) que facilitam a detecção de respostas imunitárias e a definição de potenciais alvos terapêuticos (303)

Plataformas integrativas como o sistema *MACSima Tm*, permitem a análises simultâneas de proteínas e RNA numa mesma seção de tecido, aumentando a percepção da complexa dinâmica do TME numa única célula (304–306)

#### 4.8.2.2 Imagiologia avançada

As técnicas avançadas de imagiologia como a microscopia multifotônica e a *imuno-pet*, permitem a visualização em tempo real e alta resolução das interações celulares e moleculares no interior dos tumores(307).

A Imagiologia 3D oferece insights sobre a organização espacial dos componentes do TME, incluindo as células estromais e imunitárias e as suas interações com as células cancerígenas (308–310)

#### **4.8.2.3 Modelos *in vitro* e *in vivo***

Os modelos *in vitro* e *in vivo* são complementares no estudo do TME e no teste de terapias.

Os sistemas *in vitro*, como os esferoides e organoides 3D, simulam interações celulares com a ECM. Modelos 3D de cancro da mama, com fibroblastos e macrófagos mostram a resistência aos medicamentos semelhante à observada *in vivo*, otimizando triagens rastreio (311).

Apesar de não reproduzam a integra os tumores humanos, modelos *in vivo* avaliam respostas terapêuticas em contextos fisiológicos. A integração de modelos, como os organoides colorretais combinados com abordagens *ex vivo* e modelos animais, supera limitações e apoia a terapia personalizada (257,312)

#### **4.8.3 Implicações clínicas da medicina personalizada**

A validação de biomarcadores no TME é crucial para a medicina de precisão, auxiliando na previsão da progressão do cancro e na resposta á imunoterapia.

No osteossarcoma, modelos baseados em genes relacionados com o sistema imunitário correlacionou a infiltração celular imunitária com a sobrevivência dos doentes destacando o valor do prognóstico dos biomarcadores nas estratégias de tratamento(309) (313,314).

De forma semelhante, um modelo de risco para o adenocarcinoma pulmonar envolvendo genes como o *PLK1* e *LDHA* previu resultados e respostas à imunoterapia ao refletir dinâmicas imunitárias (312) No cancro da mama, perfis de biomarcadores revelaram o impacto das células dendríticas na sobrevivência dos doentes (315–317)

Avanços recentes nos biomarcadores como o estudo o *TME-NET* identificaram células TH1, macrófagos M2 e marcadores *Stat4* e *IFNG* como fundamentais para prever a eficácia de Inibidores dos *checkpoints* imunológicos (318,319)

A resistência ás terapias emergentes realça a necessidade de biomarcadores adicionais para a personalização eficaz da terapêutica(317,320).

## **Oncologia de precisão**

A oncologia de precisão utiliza dados moleculares específicos dos doentes para desenhar tratamentos específicos e dirigidos ao cancro com o objetivo de otimizar terapêuticas, reduzir toxicidade e visar mutações utilizando biomarcadores tumorais específicos.

As abordagens diretas incluindo os inibidores de pontos de controlo imunitário e as modificações baseadas em CRISPR, permitem direcionamentos precisos ao tumor com minimização dos danos nos tecidos saudáveis(321,322).

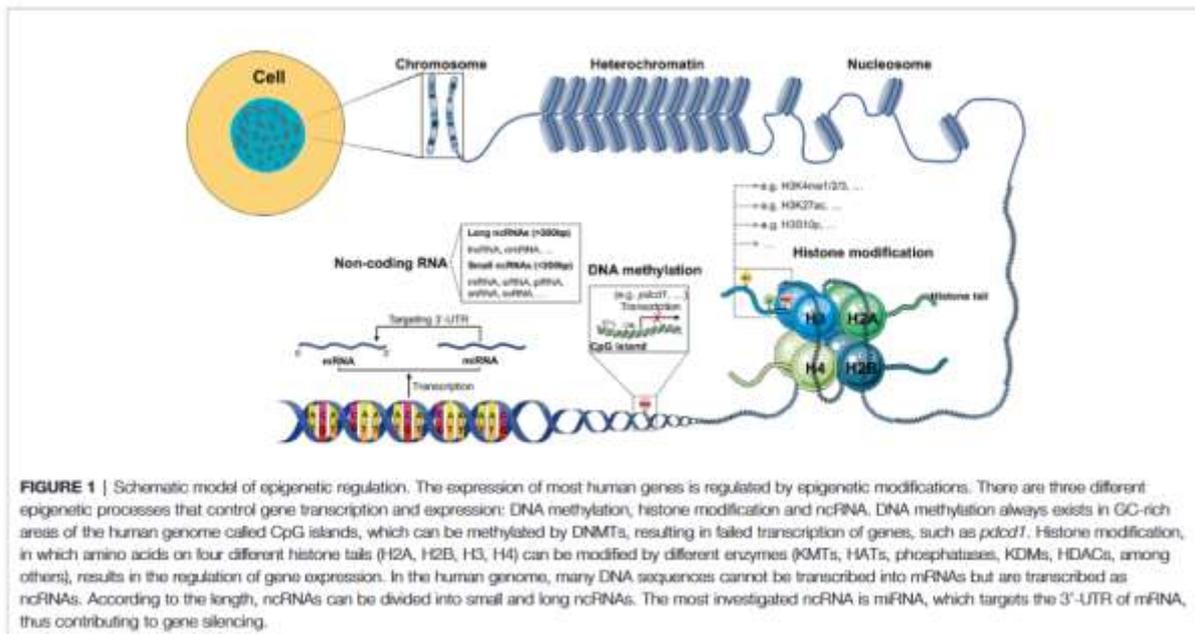
### **4.8.4 Regulação epigenética do microambiente tumoral**

A metilação do DNA, as modificações das histonas e os RNAs não codificantes orquestram alterações intrincadas no TME, (Fig.50), reprogramando as células estromais e imunitárias para favorecer o crescimento do tumor e evitar as respostas imunitárias.

A metilação do DNA e as alterações das histonas nas células estromais associadas ao tumor, como CAFs, suprimem as funções imunitárias anti tumorais através da regulação de padrões de expressão genéticas, que promovem a tolerância imunitária (323).

Os RNAs não codificantes particularmente os RNAs longos (lncRNAs) apoiam ainda mais estes processos, interagindo com reguladores epigenéticos para modular o panorama imunitário do tumor e inibir a infiltração das células imunitárias (247)

Em conjunto estas modificações contribuem para a evasão imunitária, permitindo assim que os tumores evitem a deteção e o ataque das células imunitárias (324).



**Figura 50-Regulação epigenética (324)**

### Potencial terapêutico

A regulação epigenética oferece potencial terapêutico ao visar a metilação reversível do DNA, as modificações da histona e os RNAs não codificantes para restaurar as respostas imunitárias normais e inibir os TME de apoio ao tumor.

Fármacos como os *Inibidores da DNA-Metiltransferase* e os *Inibidores da Histona Desacetilase* re-sensibilizam os tumores para a vigilância imunitária, revertendo potencialmente a evasão imunitária e tornando os cânceros sensíveis à imunoterapia(325,326).

Estes agentes reativam genes supressores de tumor silenciados e promovem respostas imunológicas como demonstrado pelo uso de azacitidina (DNMTi) e Vorinostat (HDACi) em estudos pré-clínicos e clínicos(325,326)

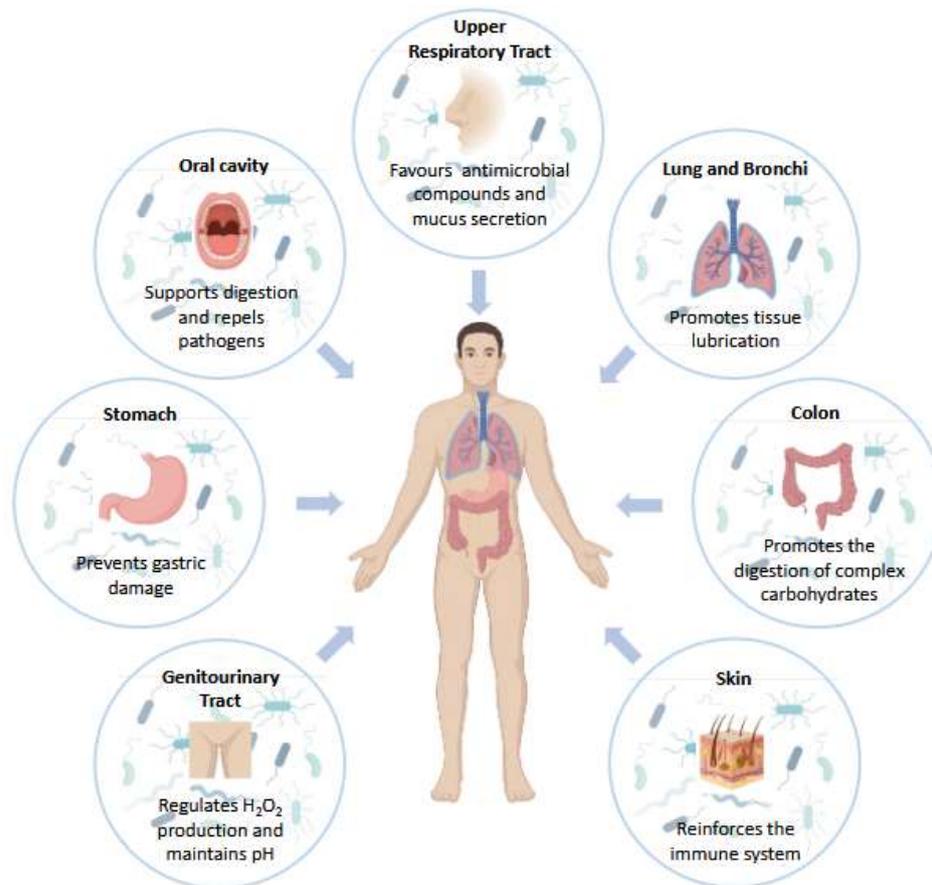
Além disso a modulação dos RNAs não codificantes pode interromper a sinalização oncogênica, aumentando a imunidade antitumoral e reduzindo o risco de metástases(327).

#### 4.8.5 Microbioma e o microambiente tumoral

O Microbioma desempenha um papel fundamental na formação do TME, influenciando a progressão do cancro, a modulação imunitária e a resposta à terapêutica(328).

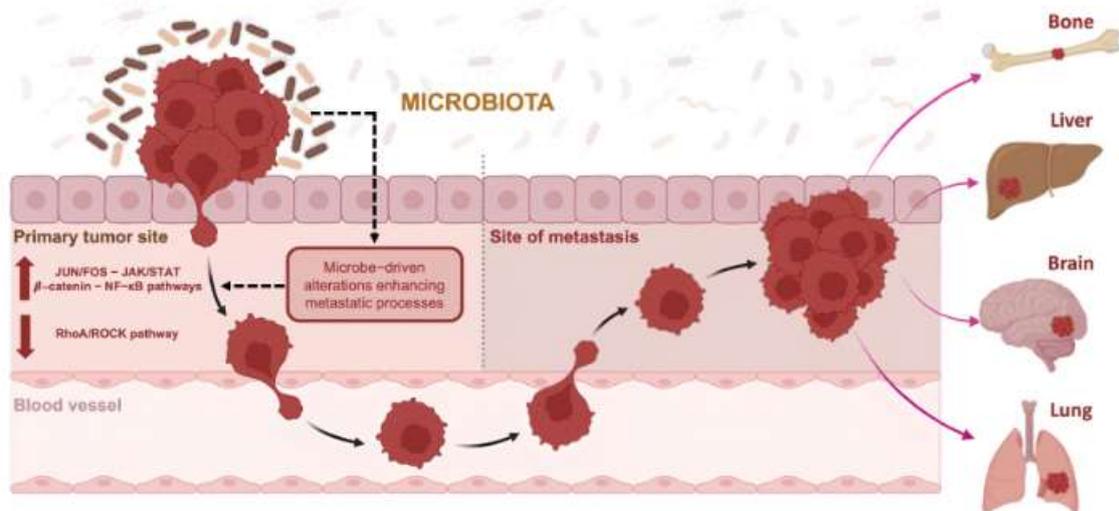
O Microbioma intestinal comunica com o TME, através de vias de sinalização imunitária, influenciando a inflamação e a atividade das células imunitárias, que por sua vez podem promover ou inibir o crescimento do tumor, (Fig. 51-53).

Além disso, a microbiota intratumoral interage diretamente dentro dos tumores, afetando a supressão imunitária, (Fig.54), e a eficácia terapêutica tal como a resistência à quimioterapia e imunoterapia(323,328) .



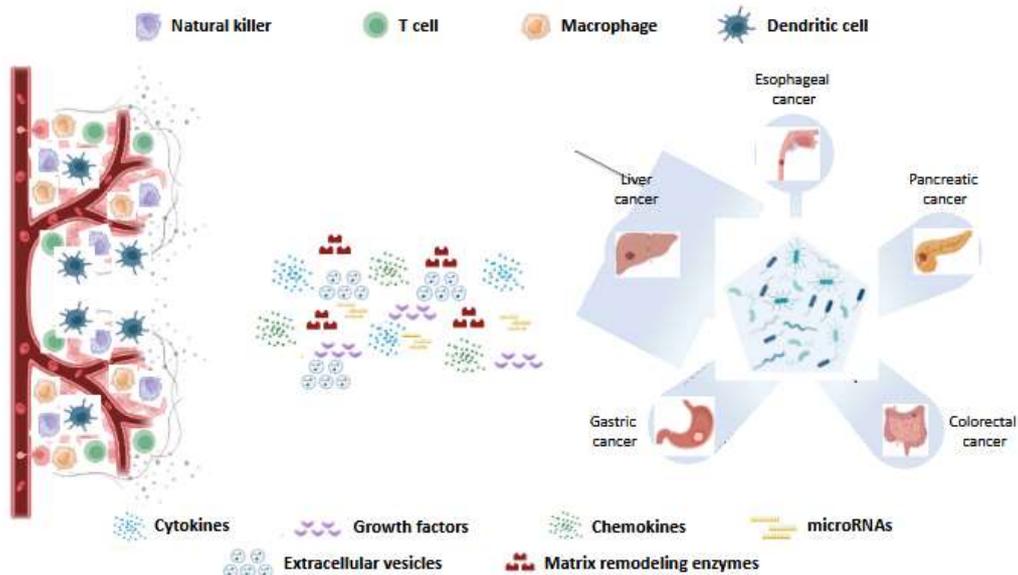
**Figure 1.** Different anatomical sites of human microbiota and its functions. In the upper respiratory tract, the microbiota contributes to the production of mucus and antimicrobial chemicals. In the lungs and the bronchi, the microbiota promotes tissue lubrication. In the colon, microbiota aids the digestion of complex carbohydrates. The skin microbiota strengthens the immune system. In the genitourinary tract, microbiota maintains pH and regulates  $H_2O_2$  production. The gastric microbiota prevents stomach damage. The oral microbiota promotes digestion and limits pathogen ingestion.

**Figura 51-Funções da microbiota nos seus locais anatómicos(328)**



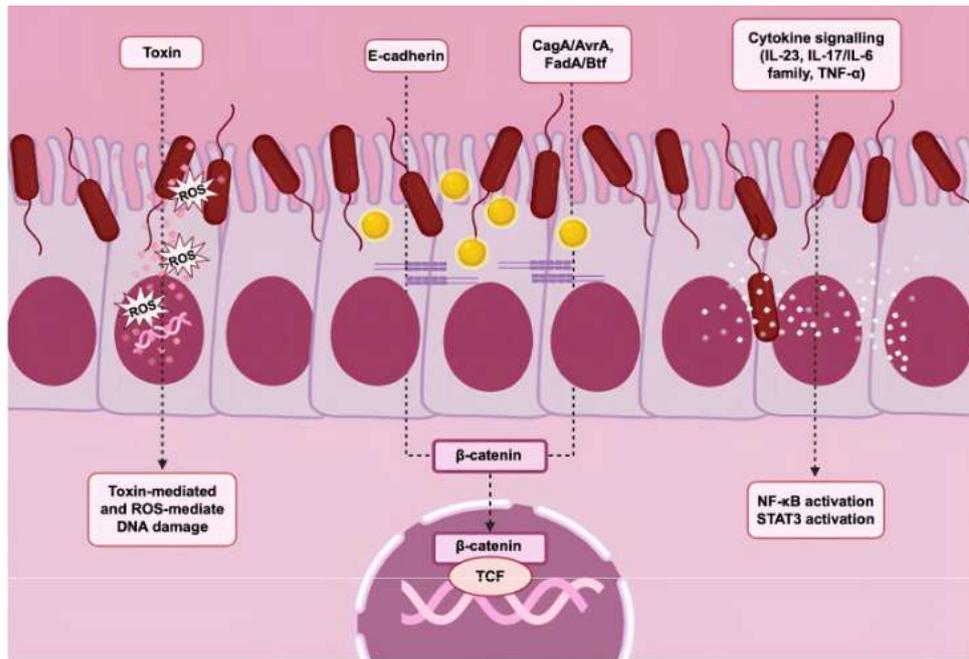
**Figure 2.** Intratumoral microbiota may facilitate metastasis formation by impairing the mucosal barrier and prompting EMT modifications in cancer cells. The metastatic tumor cells thus invade adjacent tissue as single cells or as clusters of cells and then reach and penetrate blood vessels during intravasation. Finally, tumor cells colonize distal organs, forming metastases in tissues such as the lungs, liver, brain, and bones.

**Figura 52-A** Microbiota intratumoral pode facilitar a metastização(328)



**Figure 3.** Crosstalk between digestive tumor-associated microbiota and tumor microenvironment (TME). The tumor-infiltrating bacteria can promote immunosuppression or immune reactivation by acting on metabolism and can create a heterogeneous tumor microenvironment to cause cancer initiation and development.

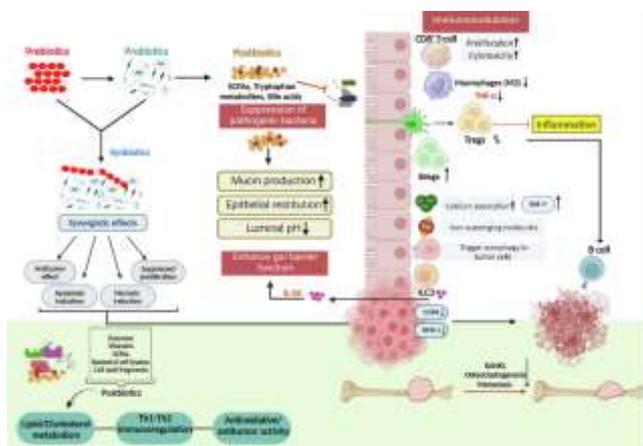
**Figura 53-A** interação entre o Microbioma intestinal e o TME(328)



**Figure 4.** The intratumoral microbiota promotes tumorigenesis and tumor progression through several mechanisms. Many microbes produce compounds like toxins and ROS that can directly cause DNA damage and thus increase mutagenesis. Other microbes promote the activation of oncogenic pathways, such as the  $\beta$ -catenin signaling pathway. For instance, cytotoxin-associated antigen A (CagA) produced by *H. pylori*, *FadA* produced by *F. nucleatum*, *Btf* produced by *B. fragilis*, and *AvrA* produced by *S. typhi* interact with E-cadherin or  $\beta$ -catenin enhancing the abnormal proliferation of cancer cells. Intratumoral microorganisms also influence cytokine production, inducing a proinflammatory response and inhibiting the immune response. Finally, the activation of  $\beta$ -catenin induces the nuclear translocation of the  $\beta$ -catenin/T-cell factor/lymphoid enhancer factor family (TCF/LEF) complex, which promotes the transcription of different tumorigenic genes.

**Figura 54 A Microbiota intratumoral promove a progressão do tumor(328)**

Ao modificarmos os componentes específicos do Microbioma, podemos explorar potenciais estratégias terapêuticas, ( Fig. 55) para aumentar a ativação imunitária e melhorar os resultados das terapias (329)



**Figura 55-Modulação do microbioma para fins terapêuticos (329)**

#### **4.8.6 Estudos comparativos através dos diferentes tipos de cancro**

Os estudos comparativos podem revelar características únicas e partilhadas entre os diferentes tipos de cancro permitindo assim o desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas.

Os estudos comparativos podem versar sobre diferentes dimensões da carcinogénese como: por exemplo composição do TME e paisagem imunitária(330), alterações genómicas e epigenómicas (95) reprogramação metabólica e tipos de tumor, respostas terapêuticas e mecanismos de resistência(331), predição de biomarcadores de prognóstico (332,333) e a influencia do Microbioma nos diferentes tipos de tumor.

A compreensão destas variações pode revelar mecanismos de evasão imunitária e potenciais alvos de imunoterapia.

## 5 Conclusão

A importância do microambiente tumoral no cancro tem sido verificada ao longo de mais de um século de investigação científica.

A compreensão aprofundada do microambiente tumoral transforma o paradigma da investigação oncológica e da prática clínica, e sublinha o seu papel central na dinâmica do cancro.

A sua influência abrangente na iniciação, progressão, metastização e resistência terapêutica posiciona o microambiente tumoral como um elemento chave, não apenas na compreensão da biologia tumoral, mas também no reimaginar de estratégias terapêuticas.

Ao longo deste trabalho, ficou claro que o microambiente tumoral é mais do que um coadjuvante na malignidade, é ator participativo desta dinâmica, molda a evolução do tumor, ao mesmo tempo que oferece novas oportunidades de intervenção.

Desde a angiogénese induzida pela hipóxia, até à evasão imunitária e a reprogramação metabólica, os mecanismos do microambiente tumoral destacam tanto a complexidade quanto a plasticidade deste sistema, que pode ser um aliado do tumor e um alvo terapêutico estratégico.

A exploração do microambiente tumoral aproxima-nos de terapias mais personalizadas e eficazes, abre caminho à superação de barreiras terapêuticas, que durante décadas, limitaram os avanços no tratamento desta doença.

O futuro da oncologia está intrinsecamente ligado á capacidade de integrar abordagens tradicionais com intervenções inovadoras que reprogramem o microambiente tumoral, promovendo sinergias que poderão mudar o curso desta doença devastadora.

Esta visão integrativa, sustentada por investigação continua e colaboração interdisciplinar, representa uma nova era de esperança para os doentes oncológicos.

## Bibliografia

1. Bickers DR, Lowy DR. Carcinogenesis: A Fifty-Year Historical Perspective. *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 1989 [cited 2024 Nov 10];92(4):S121–31. Available from: <https://doi.org/10.1038/jid.1989.39>
2. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
3. Moraes R dos SN àdrian. Introdução 1.1 Câncer: uma doença genética [Internet]. 2016 [cited 2024 Sep 18]. Available from: [https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/33320/33320\\_1.PDF](https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/33320/33320_1.PDF)
4. Loeb LA, Harris CC. Advances in chemical carcinogenesis: A historical review and prospective. Vol. 68, *Cancer Research*. 2008. p. 6863–72.
5. Bhat AS, Ahmed M, Abbas K, Mustafa M, Alam M, Salem MAS, et al. Cancer Initiation and Progression: A Comprehensive Review of Carcinogenic Substances, Anti-Cancer Therapies, and Regulatory Frameworks. *Asian Journal of Research in Biochemistry*. 2024 Jun 22;14(4):111–25.
6. Weinberg R. Tumor suppressor genes. *Neuron*. 1993 Aug 1;11(2):191–6.
7. Passaro A, Al Bakir M, Hamilton EG, Diehn M, André F, Roy-Chowdhuri S, et al. Cancer biomarkers: Emerging trends and clinical implications for personalized treatment. Vol. 187, *Cell*. Elsevier B.V.; 2024. p. 1617–35.
8. Wang Q, Shao X, Zhang Y, Zhu M, Wang FXC, Mu J, et al. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy [Internet]. Vol. 12, *Cancer Medicine*. John Wiley and Sons Inc; 2023 [cited 2024 Nov 9]. p. 11149–65. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cam4.5698>
9. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72(3 S):962–70.
10. Luch A. Nature and nurture - Lessons from chemical carcinogenesis. Vol. 5, *Nature Reviews Cancer*. 2005. p. 113–25.
11. Menson KE, Coleman SRM. Smoking and pulmonary health in women: A narrative review and behavioral health perspective. *Prev Med (Baltim)*. 2024 Aug 1;185.
12. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. Vol. 68. 1971.

13. Paolo Vineis 1 ASJDP. 2010Vinels Models. *Carcinogenesis* [Internet]. 2010 Apr 29 [cited 2024 Nov 9];31(10):1703–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20430846/>
14. Shimada S, Tanaka S. A new era for understanding genetic evolution of multistep carcinogenesis. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00535-019-01576-8>
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [Internet]. Vol. 144, *Cell*. 2011 [cited 2024 Nov 9]. p. 646–74. Available from: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(11\)00127-9](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(11)00127-9)
16. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46.
17. Gatenby RA, Vincent TL. An Evolutionary Model Of Carcinogenesis [Internet]. Vol. 63, *CANCER RESEARCH*. 2003. Available from: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/19/6212/2507249/ch1903006212.pdf>
18. Gutiérrez-Martínez A, Sew WQG, Molano-Fernández M, Carretero-Junquera M, Herranz H. Mechanisms of oncogenic cell competition—Paths of victory. Vol. 63, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2020. p. 27–35.
19. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. Vol. 21, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2015. p. 846–53.
20. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma [Internet]. Vol. 68. 1971. Available from: <https://www.pnas.org>
21. FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002 Dec 16;29(6):15–8.
22. Fulbright LE, Ellermann M, Arthur JC. The microbiome and the hallmarks of cancer. Vol. 13, *PLoS Pathogens*. Public Library of Science; 2017.
23. Darwiche N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair [Internet]. Vol. 10, *Am J Cancer Res*. 2020. Available from: [www.ajcr.us/](http://www.ajcr.us/)
24. Meirson T, Gil-Henn H, Samson AO. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. Vol. 39, *Oncogene*. Springer Nature; 2020. p. 2024–6.

25. Carlberg C, Velleuer E. Multi-step Tumorigenesis and Genome Instability. In: Carlberg C, Velleuer E, editors. *Cancer Biology: How Science Works* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 41–53. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-75699-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-75699-4_4)
26. Barrett JC. Mechanisms of Multistep Carcinogenesis and Carcinogen Risk Assessment. Vol. 100, *Environmental Health Perspectives*. 1993.
27. Fearon EF, Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. Vol. 61, *Cell*. 1990.
28. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* [Internet]. 2000 Nov 16 [cited 2024 Nov 9];408(6810):307–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11099028/>
29. Yamada Y, Mori H. Multistep carcinogenesis of the colon in *ApcMin/+* mouse. Vol. 98, *Cancer Science*. 2007. p. 6–10.
30. Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa t, Egawa N, et al. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. *Am J cancer res* [Internet]. 2011 Aug 18;7(1):869–81. Available from: [www.ajcr.us](http://www.ajcr.us)
31. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Vol. 10, *Nature Medicine*. 2004. p. 789–99.
32. Tubiana M. Généralités sur la cancérogenèse. *C R Biol*. 2008 Feb;331(2):114–25.
33. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. 2004. p. 665–76.
34. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*. 2014 Dec;15(12):1243–53.
35. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow. *The lancet* [Internet]. 2001 Feb 17 [cited 2024 Nov 10];357(9255):539–345. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S0140-6736%2800%2904046-0>
36. Gillies RJ, Verduzco D, Gatenby RA. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer*. 2012. p. 487–93.

37. Yager JD, Davidson NE, Hopkins Bloomberg J. mechanisms of disease Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer [Internet]. Vol. 354, N Engl J Med. 2006. Available from: [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
38. Culig Z, Santer FR. Androgen receptor signaling in prostate cancer. Vol. 33, Cancer and Metastasis Reviews. Kluwer Academic Publishers; 2014. p. 413–27.
39. García-Gómez E, Vázquez-Martínez ER, Reyes-Mayoral C, Cruz-Orozco OP, Camacho-Arroyo I, Cerbón M. Regulation of Inflammation Pathways and Inflammasome by Sex Steroid Hormones in Endometriosis. Vol. 10, Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media S.A.; 2020.
40. Riffo-Vasquez Y, Ligeiro De Oliveira AP, Page CP, Spina D, Tavares-De-Lima W. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice Clinical and Experimental Allergy.
41. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. Vol. 11, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2010. p. 220–8.
42. Casacuberta-Serra S, González-Larreategui Í, Capitán-Leo D, Soucek L. MYC and KRAS cooperation: from historical challenges to therapeutic opportunities in cancer. Vol. 9, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2024.
43. Casacuberta-Serra S, González-Larreategui Í, Capitán-Leo D, Soucek L. MYC and KRAS cooperation: from historical challenges to therapeutic opportunities in cancer. Vol. 9, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2024.
44. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Sep 1;8(9).
45. Herman JG, Baylin SB. mechanisms of disease Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation [Internet]. 2003. Available from: [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
46. Fulbright LE, Ellermann M, Arthur JC. The microbiome and the hallmarks of cancer. Vol. 13, PLoS Pathogens. Public Library of Science; 2017.
47. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. Vascular health and Risk management [Internet]. 2006 [cited 2024 Nov 10];3(2):213–9. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1993983/pdf/vhrm0203-213.pdf>

48. Song W, Mazziere R, Yang T, Gobe GC. Translational significance for tumor metastasis of tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
49. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. Vol. 168, *Cell*. Cell Press; 2017. p. 670–91.
50. Pote MS, Singh D, M. A A, Suchita J, Gacche RN. Cancer metastases: Tailoring the targets. Vol. 10, *Heliyon*. Elsevier Ltd; 2024.
51. Rizki A, Weaver VM, Lee SY, Rozenberg GI, Chin K, Myers CA, et al. A human breast cell model of preinvasive to invasive transition. *Cancer Res*. 2008 Mar 1;68(5):1378–87.
52. Tang S, Ning Q, Yang L, Mo Z, Tang S. Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. Vol. 86, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2020.
53. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. Vol. 35, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2015. p. S185–98.
54. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. Vol. 25, *Annual Review of Immunology*. 2007. p. 267–96.
55. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. Review The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* [Internet]. 2004 Aug 1 [cited 2024 Nov 11];21:137–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15308095/>
56. Guiot C, Pugno N, Delsanto PP, Deisboeck TS. Physical aspects of cancer invasion. Vol. 4, *Physical Biology*. Institute of Physics Publishing; 2007.
57. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. Vol. 278, *FEBS Journal*. 2011. p. 16–27.
58. Merchant N, Nagaraju GP, Rajitha B, Lammata S, Jella KK, S.Buchwald Z, et al. Matrix metalloproteinases: Their functional role in lung cancer. Vol. 38, *Carcinogenesis*. Oxford University Press; 2017. p. 766–80.
59. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol*. 2015 Jul 1;1(4):505–27.

60. Chiara F, Indraccolo S, Trevisan A. Filling the gap between risk assessment and molecular determinants of tumor onset. Vol. 42, *Carcinogenesis*. Oxford University Press; 2021. p. 507–16.
61. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. Vol. 9, *Nature Communications*. Nature Publishing Group; 2018.
62. Tomasetti C, Vogelstein B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* (1979). 2015 Jan 2;347(6217):78–81.
63. Harrison DJ, Doe JE. The modification of cancer risk by chemicals. Vol. 10, *Toxicology Research*. Oxford University Press; 2021. p. 800–9.
64. Bhat AS, Ahmed M, Abbas K, Mustafa M, Alam M, Salem MAS, et al. Cancer Initiation and Progression: A Comprehensive Review of Carcinogenic Substances, Anti-Cancer Therapies, and Regulatory Frameworks. *Asian Journal of Research in Biochemistry*. 2024 Jun 22;14(4):111–25.
65. Pratt MM, John K, Maclean AB, Afework S, Phillips DH, Poirier MC. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA adduct semi-quantitation in archived human tissues. Vol. 8, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI; 2011. p. 2675–91.
66. Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. Vol. 20, *Carcinogenesis*. 1999.
67. Huang AT, Tang W. Smoking-Related DNA Alkylation Events Are Mapped at Single-Nucleotide Resolution. *ACS Cent Sci*. 2023 Mar 22;9(3):346–8.
68. Fahrer J, Christmann M. DNA Alkylation Damage by Nitrosamines and Relevant DNA Repair Pathways. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
69. Armijo AL, Thongararm P, Fedeles BI, Yau J, Kay JE, Corrigan JJ, et al. Molecular origins of mutational spectra produced by the environmental carcinogen N-nitrosodimethylamine and SN1 chemotherapeutic agents. *NAR Cancer*. 2023 Jun 1;5(2).
70. Kumar N, Moreno NC, Feltes BC, Menck CFM, Van Houten B. Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: From DNA lesions to proteins. Vol. 43, *Genetics and Molecular Biology*. *Brazilian Journal of Genetics*; 2020.

71. Krasikova Y, Rechkunova N, Lavrik O. Nucleotide excision repair: From molecular defects to neurological abnormalities. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
72. Gonzalo-Hansen C, Steurer B, Janssens RC, Zhou D, Van Sluis M, Lans H, et al. Differential processing of RNA polymerase II at DNA damage correlates with transcription-coupled repair syndrome severity. *Nucleic Acids Res.* 2024 Sep 9;52(16):9596–612.
73. Sarmini L, Meabed M, Emmanouil E, Atsaves G, Robeska E, Karwowski BT, et al. Requirement of transcription-coupled nucleotide excision repair for the removal of a specific type of oxidatively induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jun 9;51(10):4982–94.
74. Guengerich FP. Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity [Internet]. Vol. 8, *The AAPS Journal*. 2006. Available from: <http://www.aapsj.org>
75. Guengerich PF. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* [Internet]. 2000 [cited 2024 Nov 12];21(3):345–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10688854/>
76. Swenberg JA, Lu K, Moeller BC, Gao L, Upton PB, Nakamura J, et al. Endogenous versus exogenous DNA adducts: Their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. Vol. 120, *Toxicological Sciences*. 2011.
77. Malkin D. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1992 May 14 [cited 2024 Nov 12];326(20):1309–15. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199205143262002>
78. Levine AJ. P53 and the immune response: 40 years of exploration—a plan for the future. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
79. Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. Cancer Risk Estimates for BRCA1 Mutation Carriers Identified in a Risk Evaluation Program [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/94/18/1365/2519891>

80. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Gareth Evans D, Lynch HT, Isaacs C, et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA*. 2010 Sep 1;304(9):967–75.
81. Basu NN, Ingham S, Hodson J, Laloo F, Bulman M, Howell A, et al. Risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a 30-year semi-prospective analysis. *Fam Cancer*. 2015 Aug 4;14(4):531–8.
82. Hall JM, Friedman L, Guenther C, Lee MK, Weberj JL, Black DM, et al. Closing in on a Breast Cancer Gene on Chromosome 17q. Vol. 50, *Am. J. Hum. Genet*. 1992.
83. Pinto EM, Fridman C, Figueiredo BC, Salvador H, Teixeira MR, Pinto C, et al. Multiple TP53 p.R337H haplotypes and implications for tumor susceptibility. *Human Genetics and Genomics Advances*. 2024 Jan 11;5(1).
84. Hung RJ, Mckay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25 A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* [Internet]. 2008;452(7187). Available from: <http://hdl.handle.net/2318/102453>
85. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, De Andrade M, Wiest JS, et al. A Major Lung Cancer Susceptibility Locus Maps to Chromosome 6q23-25. Vol. 75, *Am. J. Hum. Genet*. 2004.
86. Landi MT, Chatterjee N, Yu K, Goldin LR, Goldstein AM, Rotunno M, et al. A Genome-wide Association Study of Lung Cancer Identifies a Region of Chromosome 5p15 Associated with Risk for Adenocarcinoma. *Am J Hum Genet*. 2009 Nov 13;85(5):679–91.
87. KiYohara C. Genetic Polymorphisms Involved in Carcinogen Metabolism and DNA Repair and Lung Cancer Risk in a Japanese Population.
88. Zanetti KA, Wang Z, Aldrich M, Amos CI, Blot WJ, Bowman ED, et al. Genome-wide association study confirms lung cancer susceptibility loci on chromosomes 5p15 and 15q25 in an African-American population. *Lung Cancer*. 2016 Aug 1;98:33–42.
89. Ito H, McKay JD, Hosono S, Hida T, Yatabe Y, Mitsudomi T, et al. Association between a Genome-Wide Association Study-Identified Locus and the Risk of Lung Cancer in Japanese Population. *Journal of Thoracic Oncology*. 2012 May 1;7(5):790–8.

90. Le Marchand L, Derby KS, Murphy SE, Hecht SS, Hatsukami D, Carmella SG, et al. Smokers with the CHRNA lung cancer-associated variants are exposed to higher levels of nicotine equivalents and a carcinogenic tobacco-specific nitrosamine. *Cancer Res.* 2008 Nov 15;68(22):9137–40.
91. Hines LM, Sedjo RL, Byers T, John EM, Fejerman L, Stern MC, et al. The interaction between genetic ancestry and breast cancer risk factors among hispanic women: The breast cancer health disparities study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 2017 May 1;26(5):692–701.
92. James BA, Williams JL, Nemesure B. A systematic review of genetic ancestry as a risk factor for incidence of non-small cell lung cancer in the US. Vol. 14, *Frontiers in Genetics.* Frontiers Media S.A.; 2023.
93. Achatz MIW, Olivier M, Calvez F Le, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 2007 Jan 8;245(1–2):96–102.
94. De Moura Gallo CV, Azevedo E Silva Mendonça G, De Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: Current knowledge and perspectives. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2005 May 1;589(3):192–207.
95. Aaltonen LA, Abascal F, Abeshouse A, Aburatani H, Adams DJ, Agrawal N, et al. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature* [Internet]. 2020 Feb 6;578(7793):82–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-1969-6>
96. Landi MT, Bishop DT, MacGregor S, Machiela MJ, Stratigos AJ, Ghiorzo P, et al. Genome-wide association meta-analyses combining multiple risk phenotypes provide insights into the genetic architecture of cutaneous melanoma susceptibility. *Nat Genet.* 2020 May 1;52(5):494–504.
97. Wang Y, Zhu M, Ma H, Shen H. Polygenic risk scores: The future of cancer risk prediction, screening, and precision prevention. Vol. 1, *Medical Review.* Walter de Gruyter GmbH; 2021. p. 129–49.
98. Lane D, Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. Vol. 2, *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010.

99. Herman JG, Baylin SB. mechanisms of disease Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation [Internet]. 2003. Available from: [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
100. Kruse R, Ruzicka T. DNA mismatch repair and the significance of a sebaceous skin tumor for visceral cancer prevention. Vol. 10, Trends in Molecular Medicine. 2004. p. 136–41.
101. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: Split personalities. Vol. 9, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008. p. 517–31.
102. Kranenburg O. The KRAS oncogene: Past, present, and future. Vol. 1756, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2005. p. 81–2.
103. Deramaudt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. Vol. 1756, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2005. p. 97–101.
104. Smakman N, Borel Rinkes IHM, Voest EE, Kranenburg O. Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. Vol. 1756, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2005. p. 103–14.
105. Pretlow TP, Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): Initiation of colorectal cancer? Vol. 1756, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2005. p. 83–96.
106. Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. Vol. 1756, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2005. p. 127–44.
107. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med [Internet]. 2004;10(8):789–99. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm1087>
108. Kolonder\_MMS\_Patent\_US5922855.
109. Li SKH, Martin A. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. Vol. 22, Trends in Molecular Medicine. Elsevier Ltd; 2016. p. 274–89.
110. Fishel R, Kolodner RD. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. 1995.
111. Kolodner RD. A personal historical view of DNA mismatch repair with an emphasis on eukaryotic DNA mismatch repair. Vol. 38, DNA Repair. Elsevier B.V.; 2016. p. 3–13.

112. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, De A, et al. CANCER RISK IN MUTATION CARRIERS OF DNA-MISMATCH-REPAIR GENES. Vol. 81, *Int. J. Cancer*. Wiley-Liss, Inc; 1999.
113. Yao Y, Tao H, Kim JJ, Burkhead B, Carloni E, Gasbarrini A, et al. Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines. *Laboratory Investigation*. 2004 Jul;84(7):915–22.
114. Li SKH, Martin A. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. Vol. 22, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2016. p. 274–89.
115. Ferguson LR, Chen H, Collins AR, Connell M, Damia G, Dasgupta S, et al. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. Vol. 35, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2015. p. S5–24.
116. Comaills V, Kabeche L, Morris R, Buisson R, Yu M, Madden MW, et al. Genomic Instability Is Induced by Persistent Proliferation of Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep*. 2016 Dec 6;17(10):2632–47.
117. Marusyk A, Janiszewska M, Polyak K. Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. Vol. 37, *Cancer Cell*. Cell Press; 2020. p. 471–84.
118. Sun XX, Yu Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. Vol. 36, *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group; 2015. p. 1219–27.
119. Groothuizen FS, Sixma TK. The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structures. Vol. 38, *DNA Repair*. Elsevier B.V.; 2016. p. 14–23.
120. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 May;70(3):145–64.
121. Kushi et al. American cancer society releases guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. Vol. 66, *American Family Physician*. 2002.
122. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink AM, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *New England Journal of Medicine*. 2019 Jun 6;380(23):2225–36.

123. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. Vol. 41, *Cancer Cell*. Cell Press; 2023. p. 374–403.
124. Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: Tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. Vol. 13, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2012. p. 9545–71.
125. Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: Challenges and opportunities. Vol. 13, *BMC Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2015.
126. Chen CY, Yang SH, Chang PY, Chen SF, Nieh S, Huang WY, et al. Cancer-Associated-Fibroblast-Mediated Paracrine and Autocrine SDF-1/CXCR4 Signaling Promotes Stemness and Aggressiveness of Colorectal Cancers. *Cells*. 2024 Aug 1;13(16).
127. Möller G, Möller E. The Concept of Immunological Surveillance against Neoplasia. *Immunol Rev* [Internet]. 1976 Jan 1;28(1):3–17. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1976.tb00189.x>
128. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. Vol. 8, *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher; 2017. p. 761–73.
129. Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. Vol. 130, *Histochemistry and Cell Biology*. 2008. p. 1091–103.
130. Dominiak A, Chełstowska B, Olejarz W, Nowicka G. Communication in the cancer microenvironment as a target for therapeutic interventions. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020.
131. Wang Q, Shao X, Zhang Y, Zhu M, Wang FXC, Mu J, et al. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. Vol. 12, *Cancer Medicine*. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 11149–65.
132. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. Vol. 21, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2015. p. 846–53.

133. Fidler IJ, Poste G. From the Archives The “seed and soil” hypothesis revisited [Internet]. Vol. 9, [www.thelancet.com/oncology](http://www.thelancet.com/oncology). 2008. Available from: [www.thelancet.com/oncology](http://www.thelancet.com/oncology)
134. F DH. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1986 Dec 25;315(26):1650–9. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>
135. BURNET M. CHAPTER VIII - IMMUNOLOGICAL SURVEILLANCE. In: BURNET M, editor. *Immunological Surveillance* [Internet]. Pergamon; 1970. p. 161–85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080174815500122>
136. Ribatti D. *Oncotarget* 7175 [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget) The concept of immune surveillance against tumors: The first theories [Internet]. Vol. 8, *Oncotarget*. 2017. Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
137. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):46–54.
138. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Vol. 21, *Cancer Cell*. Cell Press; 2012. p. 309–22.
139. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Vol. 19, *Nature Medicine*. 2013. p. 1423–37.
140. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Vol. 541, *Nature*. Nature Publishing Group; 2017. p. 321–30.
141. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Vol. 19, *Nature Medicine*. 2013. p. 1423–37.
142. Wessel KM, Kaplan RN. Targeting tumor microenvironment and metastasis in children with solid tumors. Vol. 34, *Current Opinion in Pediatrics*. Lippincott Williams and Wilkins; 2022. p. 53–60.
143. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. Vol. 39, *Immunity*. 2013. p. 1–10.
144. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018 May 1;24(5):541–50.

145. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018 May 1;24(5):541–50.
146. Fares CM, Eliezer ;, Van Allen M, Drake CG, Allison JP, Hu-Lieskovan S. DEVELOPMENTAL IMMUNOTHERAPY AND TUMOR IMMUNOBIOLOGY Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? 2024; Available from: <https://doi.org/>
147. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006;6(5):392–401. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
148. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. Vol. 20, *Nature Reviews Cancer*. Nature Research; 2020. p. 174–86.
149. Yin J, Zhu W, Feng S, Yan P, Qin S. The role of cancer-associated fibroblasts in the invasion and metastasis of colorectal cancer. Vol. 12, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media SA; 2024.
150. Jenkins BH, Buckingham JF, Hanley CJ, Thomas GJ. Targeting cancer-associated fibroblasts: Challenges, opportunities and future directions. Vol. 240, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2022.
151. Linares J, Marín-Jiménez JA, Badia-Ramentol J, Calon A. Determinants and Functions of CAFs Secretome During Cancer Progression and Therapy. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
152. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2002;3(5):349–63. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm809>
153. Chen CY, Yang SH, Chang PY, Chen SF, Nieh S, Huang WY, et al. Cancer-Associated-Fibroblast-Mediated Paracrine and Autocrine SDF-1/CXCR4 Signaling Promotes Stemness and Aggressiveness of Colorectal Cancers. *Cells*. 2024 Aug 1;13(16).
154. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. Vol. 211, *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press; 2014. p. 1503–23.

155. Servais C, Erez N. From sentinel cells to inflammatory culprits: Cancer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. Vol. 229, *Journal of Pathology*. 2013. p. 198–207.
156. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L, et al. Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy. Vol. 12, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2019.
157. Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: A diabolic liaison driving cancer progression. Vol. 31, *Cancer and Metastasis Reviews*. 2012. p. 195–208.
158. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. Vol. 20, *Nature Reviews Cancer*. Nature Research; 2020. p. 174–86.
159. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2017 Mar 6;214(3):579–96.
160. Chen PY, Wei WF, Wu HZ, Fan LS, Wang W. Cancer-Associated Fibroblast Heterogeneity: A Factor That Cannot Be Ignored in Immune Microenvironment Remodeling. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
161. Li G, Chen Z. Challenges of Targeting Tumor Microenvironment in Prostate Cancer [Internet]. 2024 Aug. Available from: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
162. Forsthuber A, Aschenbrenner B, Korosec A, Jacob T, Annusver K, Krajic N, et al. Cancer-associated fibroblast subtypes modulate the tumor-immune microenvironment and are associated with skin cancer malignancy. *Nat Commun* [Internet]. 2024 Nov 8;15(1):9678. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-53908-9>
163. Busch S, Landberg G. CAF-specific markers: role of the TGF $\beta$  pathway [Internet]. Vol. 2, *Oncoscience*. 2015. Available from: [www.impactjournals.com/oncoscience/](http://www.impactjournals.com/oncoscience/)
164. Chung JYF, Chan MKK, Li JSF, Chan ASW, Tang PCT, Leung KT, et al. Tgf- $\beta$  signaling: From tissue fibrosis to tumor microenvironment. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
165. Nie SC, Jing YH, Lu L, Ren SS, Ji G, Xu HC. Mechanisms of myeloid-derived suppressor cell-mediated immunosuppression in colorectal cancer and related therapies.

- Vol. 16, World Journal of Gastrointestinal Oncology. Baishideng Publishing Group Inc; 2024. p. 1690–704.
166. Gilardi L, Farulla LSA, Demirci E, Clerici I, Salè EO, Ceci F. Imaging Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) with FAPi PET. Vol. 10, Biomedicines. MDPI; 2022.
  167. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. Vol. 16, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2016. p. 582–98.
  168. Raz Y, Cohen N, Shani O, Bell RE, Novitskiy S V., Abramovitz L, et al. Bone marrow-derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer. Journal of Experimental Medicine. 2018 Dec 1;215(12):3075–93.
  169. Naito Y, Yoshioka Y, Ochiya T. Intercellular crosstalk between cancer cells and cancer-associated fibroblasts via extracellular vesicles. Vol. 22, Cancer Cell International. BioMed Central Ltd; 2022.
  170. Ganguly D, Chandra R, Karalis J, Teke M, Aguilera T, Maddipati R, et al. Cancer-associated fibroblasts: Versatile players in the tumor microenvironment. Vol. 12, Cancers. MDPI AG; 2020. p. 1–35.
  171. Zhao H, Wei J, Sun J. Roles of TGF- $\beta$  signaling pathway in tumor microenvironment and cancer therapy. Vol. 89, International Immunopharmacology. Elsevier B.V.; 2020.
  172. Dillon M, Lopez A, Lin E, Sales D, Perets R, Jain P. cancers Progress on Ras/MAPK Signaling Research and Targeting in Blood and Solid Cancers. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers>
  173. Barbosa R, Acevedo LA, Marmorstein R. The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer. Vol. 19, Molecular cancer research : MCR. NLM (Medline); 2021. p. 361–74.
  174. Yaeger R, Corcoran RB. Targeting alterations in the RAF–MEK pathway. Vol. 9, Cancer Discovery. American Association for Cancer Research Inc.; 2019. p. 329–41.
  175. Tokhanbigli S, Haghi M, Dua K, Oliver BGG. Cancer-associated fibroblast cell surface markers as potential biomarkers or therapeutic targets in lung cancer. Cancer Drug Resistance. 2024 Sep 10;

176. Yoshida GJ. Regulation of heterogeneous cancer-associated fibroblasts: The molecular pathology of activated signaling pathways. Vol. 39, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central; 2020.
177. Biffi G, Oni TE, Spielman B, Hao Y, Elyada E, Park Y, et al. Il1-induced Jak/STAT signaling is antagonized by TGF $\beta$  to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2019;9(2):282–301.
178. Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. 2016; Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.279737>.
179. Wang K, Qiu X, Zhao Y, Wang H, Chen L. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma. Vol. 19, *Cancer Biology and Medicine*. *Cancer Biology and Medicine*; 2022. p. 305–18.
180. Li H, Liu W, Zhang X, Wang YF. Cancer-associated fibroblast-secreted collagen triple helix repeat containing-1 promotes breast cancer cell migration, invasiveness and epithelial-mesenchymal transition by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncol Lett*. 2021 Dec 1;22(6).
181. Zhang Q, Wang Y, Liu F. Cancer-associated fibroblasts: Versatile mediators in remodeling the tumor microenvironment. *Cell Signal*. 2023 Mar 1;103.
182. Huang J, Huang J, Huang J, Zhou L, Zhou L, Zhou L, et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021 Apr 23;6. Available from: <https://discovery.researcher.life/article/extracellular-matrix-and-its-therapeutic-potential-for-cancer-treatment/fe17cf2e67893f57a0fb0e26b838a106>
183. Yang D, Liu J, Qian H, Zhuang Q. Cancer-associated fibroblasts: from basic science to anticancer therapy. Vol. 55, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2023. p. 1322–32.
184. Wu F, Yang J, Liu J, Wang Y, Mu J, Zeng Q, et al. Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. Vol. 6, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2021.

185. Gu J, Li X, Zhao L, Yang Y, Xue C, Gao Y, et al. The role of PKM2 nuclear translocation in the constant activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in cancer-associated fibroblasts. *Cell Death Dis.* 2021 Apr 1;12(4).
186. Chen C, Liu J, Lin X, Xiang A, Ye Q, Guo J, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and regulated cell death in tumors: insights into apoptosis, autophagy, ferroptosis, and pyroptosis. Vol. 10, *Cell Death Discovery*. Springer Nature; 2024.
187. Lu C, Liu Y, Ali NM, Zhang B, Cui X. The role of innate immune cells in the tumor microenvironment and research progress in anti-tumor therapy. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
188. Lei X, Lei Y, Li JK, Du WX, Li RG, Yang J, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. Vol. 470, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2020. p. 126–33.
189. Mantovani A. Wandering pathways in the regulation of innate immunity and inflammation. Vol. 85, *Journal of Autoimmunity*. Academic Press; 2017. p. 1–5.
190. Mantovani A, Ponzetta A, Inforzato A, Jaillon S. Innate immunity, inflammation and tumour progression: double-edged swords. *J Intern Med.* 2019 May 1;285(5):524–32.
191. Jung H, Paust S. Chemokines in the tumor microenvironment: implications for lung cancer and immunotherapy. Vol. 15, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2024.
192. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011 Apr 23;29:235–71.
193. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Vol. 5, *Nature Reviews Immunology*. 2005. p. 953–64.
194. Yang Q, Guo N, Zhou Y, Chen J, Wei Q, Han M. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy. Vol. 10, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Chinese Academy of Medical Sciences; 2020. p. 2156–70.
195. Ghebremedhin A, Athavale D, Zhang Y, Yao X, Balch C, Song S. Tumor-Associated Macrophages as Major Immunosuppressive Cells in the Tumor Microenvironment. Vol. 16, *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.

196. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. Vol. 41, *Immunity*. Cell Press; 2014. p. 49–61.
197. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. Vol. 124, *Cell*. Elsevier B.V.; 2006. p. 263–6.
198. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Vol. 9, *Nature Reviews Cancer*. 2009. p. 239–52.
199. Kimm MA, Klenk C, Alunni-Fabbroni M, Kästle S, Stechele M, Ricke J, et al. Tumor-associated macrophages—implications for molecular oncology and imaging. Vol. 9, *Biomedicines*. MDPI AG; 2021.
200. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. Vol. 229, *Journal of Pathology*. 2013. p. 176–85.
201. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
202. Zhang W, Wang M, Ji C, Liu X, Gu B, Dong T. Macrophage polarization in the tumor microenvironment: Emerging roles and therapeutic potentials. Vol. 177, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2024.
203. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. Vol. 33, *Trends in Immunology*. 2012. p. 119–26.
204. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. Vol. 8, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2023.
205. Yang Q, Jeremiah Bell J, Bhandoola A. T-cell lineage determination. *Immunol Rev*. 2010 Nov;238(1):12–22.
206. Yui MA, Rothenberg E V. Developmental gene networks: A triathlon on the course to T cell identity. Vol. 14, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 529–45.
207. Hosokawa H, Rothenberg E V. Cytokines, transcription factors, and the initiation of T-cell development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 May 1;10(5).
208. Hosokawa H, Rothenberg E V. How transcription factors drive choice of the T cell fate. Vol. 21, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2021. p. 162–76.

209. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 486–99.
210. Scharping NE, Menk A V., Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, et al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*. 2016;45(2):374–88.
211. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *Journal of Clinical Investigation*. 2013 Oct 1;123(10):4479–88.
212. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. Vol. 36, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 265–76.
213. Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, Manne S, Godec J, Khan O, et al. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science (1979)*. 2016 Dec 2;354(6316):1160–5.
214. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4+ T cell populations. Vol. 28, *Annual Review of Immunology*. 2010. p. 445–89.
215. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Vol. 541, *Nature*. Nature Publishing Group; 2017. p. 321–30.
216. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Vol. 27, *Cell Research*. Nature Publishing Group; 2017. p. 109–18.
217. Wang Y, Li J, Nakahata S, Iha H. Complex Role of Regulatory T Cells (Tregs) in the Tumor Microenvironment: Their Molecular Mechanisms and Bidirectional Effects on Cancer Progression. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
218. Ryba-Stanisławowska M. Unraveling Th subsets: insights into their role in immune checkpoint inhibitor therapy. *Cellular Oncology*. Springer Science and Business Media B.V.; 2024.
219. Silva RCMC, Lopes MF, Travassos LH. Distinct T helper cell-mediated antitumor immunity: T helper 2 cells in focus. Vol. 1, *Cancer Pathogenesis and Therapy*. Chinese Medical Association; 2023. p. 76–86.

220. Li C, Jiang P, Wei S, Xu X, Wang J. Regulatory T cells in tumor microenvironment: New mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. Vol. 19, *Molecular Cancer*. BioMed Central; 2020.
221. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2019;16(6):356–71. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0175-7>
222. Del Prete A, Salvi V, Soriani A, Laffranchi M, Sozio F, Bosisio D, et al. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. Vol. 20, *Cellular and Molecular Immunology*. Springer Nature; 2023. p. 432–47.
223. Xiao Z, Wang R, Wang X, Yang H, Dong J, He X, et al. Impaired function of dendritic cells within the tumor microenvironment. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2023.
224. Yang L, Li S, Chen L, Zhang Y. Emerging roles of plasmacytoid dendritic cell crosstalk in tumor immunity. Vol. 20, *Cancer Biology and Medicine*. Cancer Biology and Medicine; 2023. p. 1–20.
225. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Vol. 473, *Nature*. 2011. p. 298–307.
226. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. Vol. 25, *Endocrine Reviews*. 2004. p. 581–611.
227. Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* (1979) [Internet]. 2005 Jan 7;307(5706):58–62. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1104819>
228. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. Vol. 18, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Research; 2021. p. 792–804.
229. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. Vol. 141, *Cell*. Elsevier B.V.; 2010. p. 39–51.
230. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. Vol. 41, *Immunity*. Cell Press; 2014. p. 49–61.

231. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*. 2003 May;111(9):1287–95.
232. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. Vol. 7, *Neuro-Oncology*. 2005. p. 452–64.
233. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. Vol. 196, *Journal of Cell Biology*. 2012. p. 395–406.
234. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jan;4(1).
235. Henke E, Nandigama R, Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. Vol. 6, *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A.; 2020.
236. Malandrino A, Mak M, Kamm RD, Moeendarbary E. Complex mechanics of the heterogeneous extracellular matrix in cancer. Vol. 21, *Extreme Mechanics Letters*. Elsevier Ltd; 2018. p. 25–34.
237. Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The matrisome: In silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2012 Apr;11(4).
238. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jan;4(1).
239. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 2005;8(3):241–54.
240. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. Vol. 22, *Current Opinion in Cell Biology*. 2010. p. 697–706.
241. Cox TR, Ertler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. Vol. 4, *DMM Disease Models and Mechanisms*. 2011. p. 165–78.
242. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):891–906.

243. Henke E, Nandigama R, Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. Vol. 6, *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A.; 2020.
244. Wullkopf L, West AK V., Leijnse N, Cox TR, Madsen CD, Oddershede LB, et al. Cancer cells' ability to mechanically adjust to extracellular matrix stiffness correlates with their invasive potential. *Mol Biol Cell*. 2018 Oct 1;29(20):2378–85.
245. Mai Z, Lin Y, Lin P, Zhao X, Cui L. Modulating extracellular matrix stiffness: a strategic approach to boost cancer immunotherapy. Vol. 15, *Cell Death and Disease*. Springer Nature; 2024.
246. Kauppila S, Stenbäck F, Risteli J, Jukkola A, Risteli L. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *Journal of Pathology*. 1998 Nov;186(3):262–8.
247. Zhu D, Zeng S, Su C, Li J, Xuan Y, Lin Y, et al. The interaction between DNA methylation and tumor immune microenvironment: from the laboratory to clinical applications. Vol. 16, *Clinical Epigenetics*. BioMed Central Ltd; 2024.
248. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. Vol. 41, *Cancer Cell*. Cell Press; 2023. p. 374–403.
249. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Vol. 15, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 786–801.
250. Hoekstra ME, Slagter M, Urbanus J, Toebes M, Slingerland N, de Rink I, et al. Distinct spatiotemporal dynamics of CD8+ T cell-derived cytokines in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2024 Jan 8;42(1):157-167.e9.
251. Abdul-Rahman T, Ghosh S, Badar SM, Nazir A, Bamigbade GB, Aji N, et al. The paradoxical role of cytokines and chemokines at the tumor microenvironment: a comprehensive review. Vol. 29, *European Journal of Medical Research*. BioMed Central Ltd; 2024.
252. Habanjar O, Bingula R, Decombat C, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.

253. Jung H, Paust S. Chemokines in the tumor microenvironment: implications for lung cancer and immunotherapy. Vol. 15, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2024.
254. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*. 2012 Dec;125(23):5591–6.
255. Logan P, Burnier J, Burnier MN. Vascular endothelial growth factor expression and inhibition in uveal melanoma cell lines. *Ecancermedicalsecience*. 2013 Jul 31;7(1).
256. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014 Sep 25;513(7519):559–63.
257. Liu Y, Yin T, Feng Y, Cona MM, Huang G, Liu J, et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant Imaging Med Surg* [Internet]. 2015 Oct;5(5):708–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26682141>
258. Zlotnik A, Yoshie O. The Chemokine Superfamily Revisited. Vol. 36, *Immunity*. Cell Press; 2012. p. 705–16.
259. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578).
260. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. Vol. 30, *Cancer Cell*. Cell Press; 2016. p. 836–48.
261. Wu J, Zheng D, Wang H, Zhou Z, Yang Q, Wu J, et al. Trends in research of exosomes associated with breast cancer over the past decade: a scientometric analysis. *Front Oncol*. 2023;13.
262. Grigoryeva ES, Savelieva OE, Popova NO, Cherdyntseva N V., Perelmuter VM. Do tumor exosome integrins alone determine organotropic metastasis? Vol. 47, *Molecular Biology Reports*. 2020.
263. Brown CE, Badie B, Barish ME, Weng L, Julie R, Chang W chung, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;21(18).

264. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2004. p. 437–47.
265. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Vol. 148, *Cell*. Elsevier B.V.; 2012. p. 399–408.
266. Chen G, Wu K, Li H, Xia D, He T. Role of hypoxia in the tumor microenvironment and targeted therapy. Vol. 12, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
267. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. Vol. 324, *Science*. 2009. p. 1029–33.
268. Lyssiotis CA, Kimmelman AC. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. Vol. 27, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 863–75.
269. Nicolini A, Ferrari P. Involvement of tumor immune microenvironment metabolic reprogramming in colorectal cancer progression, immune escape, and response to immunotherapy. Vol. 15, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2024.
270. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. Vol. 26, *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007. p. 225–39.
271. Jiang C, Kim JH, Li F, Qu A, Gavrilova O, Shah YM, et al. Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  regulates a SOCS3-STAT3-adiponectin signal transduction pathway in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Feb 8;288(6):3844–57.
272. Gonzalez-Avila G, Sommer B, Flores-Soto E, Aquino-Galvez A. Hypoxic Effects on Matrix Metalloproteinases' Expression in the Tumor Microenvironment and Therapeutic Perspectives. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
273. Verdina A, Garufi A, D'Orazi V, D'Orazi G. HIPK2 in Colon Cancer: A Potential Biomarker for Tumor Progression and Response to Therapies. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
274. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer*. 2012. p. 252–64.

275. Cai L, Li Y, Tan J, Xu L, Li Y. Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy. Vol. 16, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2023.
276. Kraehenbuehl L, Weng CH, Eghbali S, Wolchok JD, Merghoub T. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2022;19(1):37–50. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00552-7>
277. Bilotta MT, Antignani A, Fitzgerald DJ. Managing the TME to improve the efficacy of cancer therapy. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
278. Kim SK, Cho SW. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. Vol. 13, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
279. Mundhara N, Sadhukhan P. Cracking the Codes behind Cancer Cells' Immune Evasion. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
280. Gurska L, Gritsman K. Unveiling T cell evasion mechanisms to immune checkpoint inhibitors in acute myeloid leukemia. Vol. 6, *Cancer Drug Resistance*. OAE Publishing Inc.; 2023. p. 674–87.
281. Li YR, Halladay T, Yang L. Immune evasion in cell-based immunotherapy: unraveling challenges and novel strategies. Vol. 31, *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd; 2024.
282. Dutta S, Ganguly A, Chatterjee K, Spada S, Mukherjee S. Targets of Immune Escape Mechanisms in Cancer: Basis for Development and Evolution of Cancer Immune Checkpoint Inhibitors. Vol. 12, *Biology*. MDPI; 2023.
283. Bindea G, Mlecnik B, Angell HK, Galon J. The immune landscape of human tumors: Implications for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2014;3(1).
284. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012;12(4):298–306. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrc3245>

285. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. Vol. 28, *Cancer Cell*. Cell Press; 2015. p. 690–714.
286. Yang JC, Rosenberg SA. Adoptive T-Cell Therapy for Cancer. In: *Advances in Immunology*. Academic Press Inc.; 2016. p. 279–94.
287. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* (1979) [Internet]. 2015 Apr 3;348(6230):62–8. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aaa4967>
288. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine*. 2018 Jan 11;378(2):158–68.
289. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* (1979) [Internet]. 2015 Apr 3;348(6230):74–80. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aaa6204>
290. Chen L, Jiang X, Li Y, Zhang Q, Li Q, Zhang X, et al. How to overcome tumor resistance to anti-PD-1/PD-L1 therapy by immunotherapy modifying the tumor microenvironment in MSS CRC. Vol. 237, *Clinical Immunology*. Academic Press Inc.; 2022.
291. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* [Internet]. 2013;501(7467):346–54. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature12626>
292. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J*. 2017 Feb;36(3):252–9.
293. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med* [Internet]. 2017;23(10):1124–34. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
294. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. Vol. 14, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 611–29.
295. Colak S, Medema JP. Cancer stem cells - Important players in tumor therapy resistance. *FEBS Journal*. 2014;281(21):4779–91.

296. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvise M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2017 Mar 6;214(3):579–96.
297. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. Vol. 22, *Current Opinion in Cell Biology*. 2010. p. 697–706.
298. Feng B, Wu J, Shen B, Jiang F, Feng J. Cancer-associated fibroblasts and resistance to anticancer therapies: status, mechanisms, and countermeasures. Vol. 22, *Cancer Cell International*. BioMed Central Ltd; 2022.
299. Lei ZN, Tian Q, Teng QX, Wurpel JND, Zeng L, Pan Y, et al. Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. Vol. 4, *MedComm*. John Wiley and Sons Inc; 2023.
300. Song W, Mazziere R, Yang T, Gobe GC. Translational significance for tumor metastasis of tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
301. Xie F, Xi N, Han Z, Luo W, Shen J, Luo J, et al. Progress in research on tumor microenvironment-based spatial omics technologies. *Oncol Res*. 2023;31(6):877–85.
302. Sun C, Wang A, Zhou Y, Chen P, Wang X, Huang J, et al. Spatially resolved multi-omics highlights cell-specific metabolic remodeling and interactions in gastric cancer. *Nat Commun*. 2023 Dec 1;14(1).
303. Lee RY, Ng CW, Rajapakse MP, Ang N, Yeong JPS, Lau MC. The promise and challenge of spatial omics in dissecting tumour microenvironment and the role of AI. Vol. 13, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
304. Park S, Silva E, Singhal A, Kelly MR, Licon K, Panagiotou I, et al. A deep learning model of tumor cell architecture elucidates response and resistance to CDK4/6 inhibitors. *Nat Cancer*. 2024 Jul 1;5(7):996–1009.
305. Scheuermann S, Kristmann B, Engelmann F, Nuernbergk A, Scheuermann D, Koloseus M, et al. Unveiling spatial complexity in solid tumor immune microenvironments through multiplexed imaging. *Front Immunol*. 2024;15.
306. Schmidt KT, Chau CH, Price DK, Figg WD. Precision Oncology Medicine: The Clinical Relevance of Patient-Specific Biomarkers Used to Optimize Cancer Treatment. Vol. 56, *Journal of Clinical Pharmacology*. Blackwell Publishing Inc.; 2016. p. 1484–99.

307. Eissa A, Zoeir A, Sighinolfi MC, Puliatti S, Bevilacqua L, Del Prete C, et al. “Real-time” Assessment of Surgical Margins During Radical Prostatectomy: State-of-the-Art. Vol. 18, *Clinical Genitourinary Cancer*. Elsevier Inc.; 2020. p. 95–104.
308. Peng X, Wang Y, Zhang J, Zhang Z, Qi S. Intravital imaging of the functions of immune cells in the tumor microenvironment during immunotherapy. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2023.
309. Chen T, Wang M, Chen Y, Cao Y, Liu Y. Advances in predictive biomarkers associated with immunotherapy in extensive-stage small cell lung cancer. Vol. 14, *Cell and Bioscience*. BioMed Central Ltd; 2024.
310. Wang Y, Jiang Z, Zhang K, Tang H, Wang G, Gao J, et al. Whole-Tumor Clearing and Imaging of Intratumor Microbiota in Three Dimensions with miCDaL Strategy. *Advanced Science* [Internet]. 2024 Nov 8;11(44). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.202400694>
311. Domingues M, Leite Pereira C, Sarmiento B, Castro F. Mimicking 3D breast tumor-stromal interactions to screen novel cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023 Nov 1;190.
312. Li Y, Gao X, Ni C, Zhao B, Cheng X. The application of patient-derived organoid in the research of lung cancer. Vol. 46, *Cellular Oncology*. Springer Science and Business Media B.V.; 2023. p. 503–19.
313. Liu Y, Wu Z, Fu Z, Han Y, Wang J, Zhang Y, et al. A predictive model of immune infiltration and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma based on cell adhesion-related genes: including molecular biological validation. *Front Immunol*. 2023;14.
314. Chen T, Wang M, Chen Y, Cao Y, Liu Y. Advances in predictive biomarkers associated with immunotherapy in extensive-stage small cell lung cancer. Vol. 14, *Cell and Bioscience*. BioMed Central Ltd; 2024.
315. Zhong S, Jia Z, Zhang H, Gong Z, Feng J, Xu H. Identification and validation of tumor microenvironment-related prognostic biomarkers in breast cancer. *Transl Cancer Res*. 2021 Oct 1;10(10):4355–64.

316. Forker LJ, Bibby B, Yang L, Lane B, Irlam J, Mistry H, et al. Technical development and validation of a clinically applicable microenvironment classifier as a biomarker of tumour hypoxia for soft tissue sarcoma. *Br J Cancer*. 2023 Jun 29;128(12):2307–17.
317. Shao MM, Xu YP, Zhang JJ, Mao M, Wang MC. Tumor mutational burden as a predictive biomarker for non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1. *Clinical and Translational Oncology*. 2024 Jun 1;26(6):1446–58.
318. Ding SJ, Li H, Zhang YH, Zhou XC, Feng KY, Li ZD, et al. Identification of Pan-Cancer Biomarkers Based on the Gene Expression Profiles of Cancer Cell Lines. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Nov 30;9.
319. Aaltonen LA, Abascal F, Abeshouse A, Aburatani H, Adams DJ, Agrawal N, et al. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature* [Internet]. 2020 Feb 6;578(7793):82–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-1969-6>
320. Zhong S, Jia Z, Zhang H, Gong Z, Feng J, Xu H. Identification and validation of tumor microenvironment-related prognostic biomarkers in breast cancer. *Transl Cancer Res*. 2021 Oct 1;10(10):4355–64.
321. Schmidt KT, Chau CH, Price DK, Figg WD. Precision Oncology Medicine: The Clinical Relevance of Patient-Specific Biomarkers Used to Optimize Cancer Treatment. Vol. 56, *Journal of Clinical Pharmacology*. Blackwell Publishing Inc.; 2016. p. 1484–99.
322. Kargbo RB. Advances in Cancer Treatment and Monitoring: Insights from KRAS Inhibitors and Germline Epitope Burden Monitoring. *ACS Med Chem Lett* [Internet]. 2024 Nov 14;15(11):1815–7. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.4c00487>
323. Calanca N, Francisco ALN, Bizinelli D, Kuasne H, Barros Filho MC, Flores BCT, et al. DNA methylation-based depiction of the immune microenvironment and immune-associated long non-coding RNAs in oral cavity squamous cell carcinomas. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2023 Nov 1;167.
324. Yang Y, Wang Y. Role of Epigenetic Regulation in Plasticity of Tumor Immune Microenvironment. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.

325. Zhang Y, Zhang G, Wang Y, Ye L, Peng L, Shi R, et al. Current treatment strategies targeting histone deacetylase inhibitors in acute lymphocytic leukemia: a systematic review. Vol. 14, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media SA; 2024.
326. Szczepanek J, Skorupa M, Jarkiewicz-Tretyn J, Cybulski C, Tretyn A. Harnessing Epigenetics for Breast Cancer Therapy: The Role of DNA Methylation, Histone Modifications, and MicroRNA. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
327. Galassi C, Chan TA, Vitale I, Galluzzi L. The hallmarks of cancer immune evasion. *Cancer Cell* [Internet]. 2024 Oct 9; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39393356>
328. Lombardo C, Fazio R, Sinagra M, Gattuso G, Longo F, Lombardo C, et al. Intratumoral Microbiota: Insights from Anatomical, Molecular, and Clinical Perspectives. Vol. 14, *Journal of Personalized Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
329. Kapoor S, Gupta M, Sapra L, Kaur T, Srivastava RK. Delineating the nexus between gut-intratumoral microbiome and osteo-immune system in bone metastases. Vol. 23, *Bone Reports*. Elsevier Inc.; 2024.
330. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018 May 1;24(5):541–50.
331. Gatenby R, Brown J. The evolution and ecology of resistance in cancer therapy. Vol. 8, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2018.
332. Hoshida Y, Villanueva A, Sangiovanni A, Sole M, Hur C, Andersson KL, et al. Prognostic gene expression signature for patients with hepatitis C-related early-stage cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013;144(5):1024–30.
333. Aaltonen LA, Abascal F, Abeshouse A, Aburatani H, Adams DJ, Agrawal N, et al. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature* [Internet]. 2020 Feb 6;578(7793):82–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-1969-6>

# Anexos



## Declaração

Para os devidos efeitos, declara-se que a versão agora entregue do trabalho do aluno Marlene Camacho Francis, com o título "A importância do microambiente tumoral na carcinogénese" é a versão final a incluir, de acordo com a legislação em vigor, no Repositório da Universidade de Lisboa.

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, em 16 de dezembro de 2024.

O (Co)Orientador,

Ana Rita Conde

(Assinatura)

DECLARAÇÃO

Nome:

Correio Eletrónico:  Telefone:

Bilhete de Identidade / Cartão de Cidadão:

Grau:  Mestrado Integrado  Mestrado

Título do Trabalho Final:

Orientador:

Co-Orientador(es):

Domínio Científico - [\(Classificação FOS\)](#):

Faculdade/Instituto:

Designação do Curso:

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

- a) Declaro sob compromisso de honra que o trabalho final agora entregue corresponde à versão final apresentada ao júri.
- b) Declaro que concedo à Universidade de Lisboa e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, o trabalho final, no todo ou em parte, em suporte digital.
- c) Declaro que autorizo a Universidade de Lisboa a arquivar e, sem alterar o conteúdo, converter trabalho final entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, nomeadamente através da sua digitalização, para efeitos de preservação e acesso.
- d) Concordo que o trabalho final seja colocado no Repositório da Universidade de Lisboa com o seguinte estatuto (assinale apenas uma das hipóteses):
1.  Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
  2.  Disponibilização do conjunto do trabalho com acesso embargado durante:
    - 1 ano     2 anos     3 anos

Após o período acima assinalado autorizo o acesso mundial. Anexo justificação do embargo devidamente assinada pelo(s) orientador(es).
  3.  Disponibilização apenas dos metadados descritivos (autor, título, resumo, entre outros) devido a questões de confidencialidade dos dados (Acesso Restrito). Anexo justificação para a não disponibilização do texto integral, devidamente assinada pelo(s) orientador(es).
- e) Retenho todos os direitos de autor relativos ao trabalho final, e o direito de o usar em trabalhos futuros.

Lisboa,

Assinatura: