

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



A Importância do Microambiente Tumoral na Carcinogénese

Michelle Valerie Ariza González

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

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



A Importância do Microambiente Tumoral na Carcinogénese

Michelle Valerie Ariza González

**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 Silva Melo, Professora Auxiliar.

2021

Agradecimentos

Dedico este trabalho aos meus pais, obrigada pelo vosso amor incondicional. Tudo o que já fizeram por mim e pela minha irmã, atravessar um oceano, aprender uma nova língua, deixar uma vida para trás e criar uma nova desde o zero. Embora tente todos os dias, nunca serei capaz de vos retribuir. Amo-vos com todo o meu coração.

À minha maninha, embora sejamos como o dia e a noite, e brigemos sem cessar, a vida sem ti não teria as mesmas cores.

Um obrigado muito especial para a professora Ana Rita, ao iniciar a etapa da faculdade ela foi uma das minhas primeiras guias, sendo sempre uma pessoa amigável e cheia de paixão por ensinar. Não podiar ter sido melhor que finalizar o percurso da mesma forma. Do mesmo modo, agradeço aos demais professores que tem (a)cento e) acreditado em mim.

Obrigada a todas as pessoas maravilhosas que me mostraram bondade, num mundo cheio de malícia. Às conversas, risos, saídas e momentos que tivemos. Sempre irão estar comigo!

E claro, não podia esquecer dos meus cães, fies companheiros nos dias bons e maus. Sempre a cuidar de mim mais do que eu deles. Obrigada por existirem.

Resumo

O microambiente tumoral é uma entidade complexa na qual tanto as células imunes como as não imunes do hospedeiro estabelecem um *crosstalk* dinâmico com as células cancerígenas. Não é apenas um observador silencioso, mas sim um promotor ativo da progressão do cancro. Sendo assim, o interesse na sua investigação e melhor compreensão tem vindo a crescer exponencialmente nas últimas décadas. Para além de falar das propriedades distintivas adquiridas pelas células tumorais, tais como a sua capacidade de replicação ilimitada ou a resistência aos sinais de morte celular programada, esta monografia oferece uma visão geral mais abrangente das funções primárias de cada componente celular (fibroblastos associados ao cancro, células endoteliais, macrófagos associados ao cancro, adipócitos, células dendríticas, entre outros) e extra-celular (matriz extracelular, moléculas sinalizadoras, redes vasculares sanguíneas e linfáticas) que participam nas principais interações que se dão neste espaço e que irão ser aprofundados de modo a entender de uma melhor forma a maquinaria operacional da carcinogénese, tumorigénese e progressão tumoral. Para além disso, mas também são elucidados os fatores primordiais desenvolvidos dentro do microambiente do tumor, entre os quais: acidose, alteração do metabolismo celular, hipóxia, transição epitelial-mesenquimal e angiogénese, que culminam na metastização e colonização das células malignas em órgãos distantes do corpo. O trabalho também inclui mecanismos de escape imunológico e de resistência à terapêutica oncológica, que podem tornar-se ferramentas úteis no futuro do tratamento de tumores. São apresentadas algumas abordagens sobre como os constituintes do microambiente tumoral podem ser alvo de imunomodulação, vacinas contra o cancro, terapias com células CAR T e inclusivamente a aplicação da nanotecnologia na entrega direcionada de medicamentos. No entanto, percebemos que ainda há limitações no nosso conhecimento sobre o microambiente tumoral que necessitam de resposta, demonstrando que é um tema em desenvolvimento e constante actualização que promete muito mais no futuro e guiar o uso racional das terapias combinadas personalizadas para o sucesso do tratamento das doenças cancerígenas.

Doutora Ana Rita Conde, Professora Auxiliar

Palavras-chave: Cancro; Carcinogénese; Tumorigénese; Microambiente Tumoral.

Abstract

The tumor microenvironment is a complex entity in which both immune and non-immune host cells establish a dynamic crosstalk with cancer cells. It is not just a silent observer, but an active promoter of cancer progression. Therefore, the interest in its research and better understanding has been growing exponentially in recent decades. In addition to talking about the distinctive properties acquired by tumor cells, such as their capacity of unlimited replication or their resistance to programmed cell death signals, this monograph offers a more comprehensive overview of the primary functions of each cell component (cancer-associated fibroblasts , endothelial cells, cancer-associated macrophages, adipocytes, dendritic cells, among others) and extracellular component (extracellular matrix, signaling molecules, blood and lymphatic vascular networks) which participates in the main interactions that take place in this space and that will be further developed in in order to better comprehend the operational machinery of carcinogenesis, tumorigenesis and tumor progression. Not only this, but the primordial factors that are developed within the tumor microenvironment are also elucidated, including: acidosis, alteration of cell metabolism, hypoxia, epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis, which culminate in the metastasis and colonization of malignant cells in distant organs of the body. Here, some approaches are presented on how the constituents of the tumor microenvironment can be targeted for immunomodulation, cancer vaccines, CAR T cell therapies and even the application of nanotechnology in drug delivery. However, we realize that there are still limitations in our knowledge about the tumor microenvironment that need a response, demonstrating that it is a topic under development and constant updating that promises much more to come and guide the rationale of personalized combinatorial therapies for the success of the treatment of cancerous diseases.

Doctor Ana Rita Conde, Assistant Professor

Keywords: Cancer; Carcinogenesis; Tumorigenesis; Tumor Microenvironment; TME.

Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

Akt – Proteína Cinase B

ARN – Ácido Ribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

bFGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos básico

BMP – Proteína morfogenética óssea

CAFs – Fibroblastos Associados ao Cancro

cAMP – Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico

CAR – Receptor de Antígeno Quimérico

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

CTCs – Células Tumorais Circulantes

CTLA-4 – Antígeno 4 associado a Linfócitos T Citotóxicos;

DCs – Células Dendríticas

ECM – Matriz Extracelular

ECs – Células Endoteliais

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

EMT – Transição epitelial-mesenquimal

EPR – Permeabilidade e Retenção Aprimorada

ERK – Quinases Reguladas por Sinal Extracelular

FAK – Cinase de adesão focal

FAP- α – Proteína de Ativação de Fibroblastos Alfa

Fas – Antígeno da Apoptose 1

FGF2 – Fator de Crescimento de Fibroblastos 2

GLUT1 – Transportador de glicose tipo 1

GM-CSF – Fator estimulador de Colónias de granulócitos-macrófagos

HIF – Fator Induzível por Hipóxia

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Cancro

IFN- γ – Interferão Gama

IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IL – Interleucina

LDHA – Lactato desidrogenase A

MDSCs – Células Supressoras derivadas da Linhagem Mieloide

MMP's – Matriz Metaloproteinases

MSCs – Células Estaminais Mesenquimais

mtADN – ADN mitocondrial

NE – Células Neuroendócrinas

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NK – *Natural Killer*

OPN – Osteoponina

PAHs – Partículas de Carbono associadas a Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PD-1 – Proteína 1 de Morte Celular Programada

PDGF – Fator de Crescimento derivado de Plaquetas

PDGFRs – Receptores do Fator de Crescimento derivado de Plaquetas

PD-L1 – Ligando 1 de Morte Celular Programada

PHDs – Propil Hidroxilases dos HIFs

PKF – Fosfofrutoquinas

pVHL – Supressor de Tumores Von Hippel-Lindau

ROCK – Quinase Proteica Associada a Rho

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SDF-1 – Fator Derivado de Células Estromais 1

SLNS – Nódulos Linfáticos Sentinela

TAA – Antígenos Associados ao Tumor

TAMs – Macrófagos Associados ao Tumor

TE – Exossomas Tumorais

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento Beta

Th-1 – Células T Auxiliares 1

TME – Microambiente Tumoral

TNFR1 – Recetor do Fator de Necrose Tumoral 1

Tregs – Células T Reguladoras

UV – Ultravioleta

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR – Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

WAT – Tecido Adiposo Branco

α -SMA – Alfa-actina do músculo liso

Índice

Agradecimentos	5
Resumo	6
Palavras-chave.....	6
Abreviaturas	8
1. Objetivo	13
2. Métodos.....	13
3. Introdução.....	14
4. O Cancro	14
4.1. O que é o cancro?.....	14
4.2. Causas e fatores de risco	15
4.3. Alterações dos genes no cancro	16
4.4. A carcinogénese e as células cancerígenas	18
5. O microambiente tumoral.....	19
5.1. O que é o microambiente tumoral?	19
5.2. Quais são os constituintes do TME e o seu papel na doença oncológica?	20
5.2.1. Constituintes celulares.....	20
5.2.1.1. Células cancerígenas	20
5.2.1.2. Células do estroma	20
5.2.1.3. Células imunológicas	24
5.2.1.4. Outros tipos de células	27
5.2.2. Constituintes extracelulares.....	29
6. Fatores induzidos no microambiente tumoral envolvidos na carcinogénese e nas resistências terapêuticas.....	32
6.1. Acidose e metabolismo alterado.....	32
6.2. Hipóxia.....	34
6.3. Transição epitelial-mesenquimal (EMT)	35
6.4. Angiogénese	36
6.5. Metastização	38
7. Aplicações do microambiente tumoral na terapia oncológica	40
8. Conclusão.....	43
9. Referências bibliográficas.....	45

Índice de Figuras

Fig.1 - Desenvolvimento de células normais <i>versus</i> células cancerígenas; A metástase.....	14
Fig.2 - O papel dos genes e do meio ambiente no desenvolvimento do cancro.....	15
Fig.3 - Genes associados ao risco de diferentes tipos de cancro.....	17
Fig.4 - O processo cancerígeno: iniciação, proliferação e progressão da malignidade.....	18
Fig.5 - O microambiente tumoral.....	20
Fig.6 - Diferentes sub-tipos de CAFs e as suas funções no TME.....	21
Fig.7 - Funções das células endoteliais no TME.....	22
Fig.8 - O Impacto das células imunes no microambiente tumoral.....	24
Fig.9 - Interações entre os adipócitos e as células estromais presentes no TME.....	28
Fig.10 - Como a ECM tumoral afeta a eficácia dos tratamentos sistémicos.....	30
Fig.11 - Moléculas, citocinas e fatores de crescimento celular secretados no TME.....	31
Fig.12 - Mecanismos moleculares pelos quais o ácido láctico modula as respostas das células imunológicas.....	33
Fig.13 - O papel da hipóxia na angiogénese tumoral.....	34
Fig.14 - Transição epitelial-mesenquimal.....	35
Fig.15 - Comparação entre a vasculatura normal (a) e a tumoral (b); O mimetismo vasculogénico conformado por uma rede de células tumorais (e).....	37
Fig.16 - Principais etapas no processo de metastização e os seus efetores.....	38

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Algumas estratégias terapêuticas oncológicas com diferentes abordagens que tem em consideração a importância do TME.....	41
---	----

1. Objetivo

O objetivo principal desta monografia é compreendermos o papel do microambiente tumoral na carcinogênese. Começaremos por falar no cancro, é imperativo conhecer as suas causas, desenvolvimento e progressão. Posteriormente, aprofundaremos o tema central, respondendo a questões como: o que é o microambiente tumoral? Quais são os seus constituintes? Quais são as interações que se dão neste espaço e que contribuem para a carcinogênese e a progressão tumoral? Quais são algumas das suas aplicações para o futuro da terapêutica oncológica?

2. Métodos

A pesquisa bibliográfica começou no Pubmed e nas fontes bibliográficas recomendadas na unidade curricular de Biologia Celular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Os conceitos pesquisados no Pubmed foram: “cancer”, “cancer microenvironment”, “tumor microenvironment”, “TME”, “carcinogenesis”, “tumorigenesis”. Também foram consultadas páginas de internet de organizações nacionais e internacionais ligadas ao tratamento e investigação do cancro. Numa fase posterior, foram pesquisados termos mais específicos em associação com o conceito de “tumor microenvironment” no Pubmed, entre os quais: “cancer associated fibroblasts”, “tumor associated macrophages”, “acidosis”, “hypoxia” e “angiogenesis”.

3. Introdução

O cancro é uma doença tão antiga como a existência da humanidade. Algumas das primeiras evidências das doenças oncológicas foram encontradas entre tumores ósseos fossilizados, múmias humanas no antigo Egito, papiros que datam do ano 3000 a.C. e outros manuscritos. Com os avanços científicos nas áreas da medicina e cirurgia, conseguiu-se uma maior compreensão do corpo humano e a relação existente entre a doença com a sua causa patológica após a morte (1).

Actualmente, mesmo com toda a tecnologia disponível, as neoplasias são um problema de saúde pública que demandam elevados custos sócio-económicos, sendo em Portugal a segunda causa de morte e das que mais subiram nos últimos anos (2). No sumário estatístico de 2020 da Agência internacional de Pesquisa em Cancro (IARC), estima-se que cerca de 25,7% da população portuguesa corre o risco de desenvolver uma doença oncológica e 10,7% pode vir morrer de cancro antes dos 75 anos (3). Em última análise, uma doença tão mortal, deve ser entendida nos níveis molecular e celular (4).

4. O Cancro

4.1. O que é o cancro?

O cancro é definido como um conjunto de doenças relacionadas, onde há o crescimento e a proliferação descontrolada de células que sofreram mutações nos genes que controlam o seu funcionamento (5). A disseminação, diferenciação e sobrevivência de células individuais em organismos multicelulares são cuidadosamente reguladas para atender às necessidades do organismo como um todo. Esta regulação perde-se nas células cancerígenas (4). O processo pelo qual as células anómalas invadem outras partes do corpo através dos sistemas circulatório ou linfático e interferem com o funcionamento dos tecidos e órgãos normais, é chamado de metástase (Fig.1) (4,5). Geralmente, quando um cancro consegue metastatizar, ele é altamente heterogéneo, resistente à terapêutica oncológica e com alta probabilidade de ser letal (6).

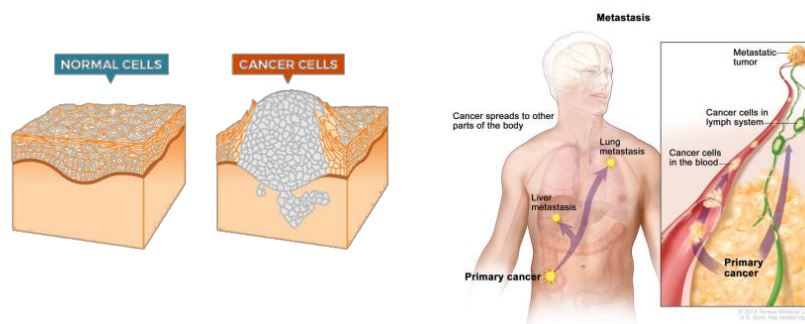


Fig.1 - Desenvolvimento de células normais *versus* células cancerígenas; A metástase (5)

Uma vez que, todo processo cancerígeno tem origem na unidade base da vida, a doença pode começar em quase qualquer lugar do corpo humano, que é composto por trilhões de células agrupadas para formar os nossos órgãos (7). Existem mais de cem tipos de câncros (4). Alguns crescem e metastizam rapidamente, outros mais lentamente. A resposta ao tratamento anti-cancerígeno também difere consoante o tipo de câncro (4,5). A maioria se enquadra em um dos três grupos principais: os carcinomas (90% dos casos), que têm a sua origem nas células epiteliais; os sarcomas (são raros), que são tumores sólidos de tecidos conjuntivos, como músculos, ossos, cartilagens e tecido fibroso; e as leucemias e os linfomas (7% dos casos), que surgem das células formadoras do sangue e das células do sistema imunológico, respetivamente (4).

4.2. Causas e fatores de risco

O câncro é uma doença genética, isto é, afeta o nosso ADN. As mudanças podem ser causadas devido a erros que ocorrem à medida que as células se dividem (5). No entanto, ao contrário do que habitualmente se pensa, sabemos que apenas 10% do risco de desenvolver câncro provém da informação genética herdada dos nossos progenitores, isto significa que cerca de 90% dos câncros estão relacionados com fatores adquiridos do ambiente, chamados cancerígenos ou carcinógenos, e dos maus hábitos comportamentais (Fig.2) (8), que incluem:

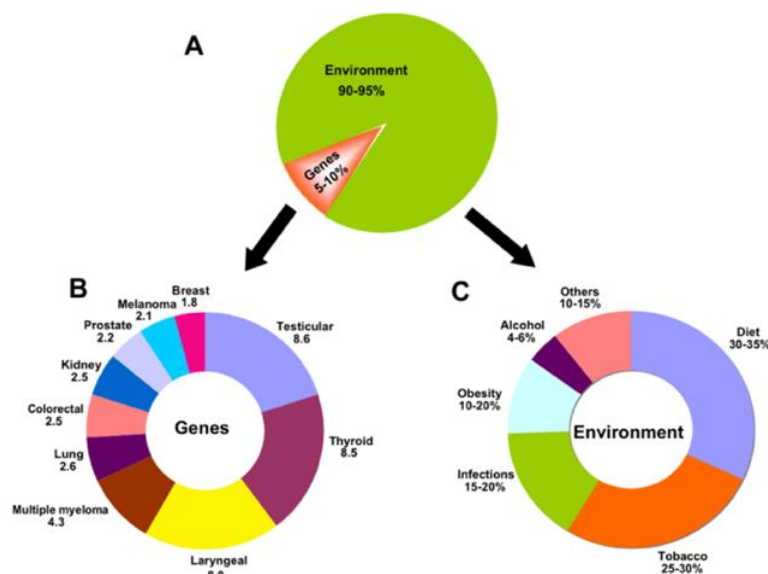


Fig.2 - O papel dos genes e do meio ambiente no desenvolvimento do cancro (9)

Agentes cancerígenos físicos

O câncro pode ser induzido por radiação, tanto ionizante como não-ionizante, tipicamente proveniente de substâncias radioativas como os raios-x usados em ambientes médicos, a radiação gama e a radiação solar UV (9).

Agentes cancerígenos químicos

São um grupo muito heterogêneo de substâncias. Incluem-se os componentes presentes no fumo do tabaco, o consumo crónico de álcool, a poluição ambiental do ar externo por partículas de carbono associadas a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs); a poluição ambiental do ar interno por formaldeído e compostos orgânicos voláteis, como benzeno e 1,3-butadieno; a poluição alimentar por nitratos, nitrosaminas, pesticidas, dioxinas, aditivos alimentares e outros organoclorados; os metais carcinógenos e metalóides (9).

Agentes cancerígenos biológicos

São neoplasias associadas a infecções. Os vírus são os maiores responsáveis, entre os quais incluem-se o Vírus do Papiloma Humano, Vírus de Epstein Barr, Vírus do Herpes associado ao sarcoma de Kaposi, Vírus Linfotrópico T Humano 1, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Hepatite B e Vírus da Hepatite C. No entanto, outros microrganismos, incluindo parasitas, como *Opisthorchis viverrini* ou *Schistosoma haematobium* e bactérias, como *Helicobacter pylori*, também podem estar envolvidos, agindo como co-fatores e/ou carcinógenos (9).

Além destes agentes externos conhecidos, outros fatores importantes incluem:

O envelhecimento, que é um fator fundamental para o desenvolvimento da doença. A incidência de cancro aumenta dramaticamente com a idade, provavelmente ocasionado pelo acúmulo de riscos e a tendência de os mecanismos de reparação celular serem menos eficazes à medida que uma pessoa envelhece (8,10). Mesmo assim, esta doença pode atingir qualquer grupo etário, incluindo jovens e crianças (2).

O aumento da modernização, uma dieta pobre e estilo de vida sedentário foram associados a um aumento da prevalência de pessoas com sobrepeso em muitos países em desenvolvimento. Os denominadores comuns entre obesidade e cancro também incluem neuroquímicos; hormonas como fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), insulina, leptina; esteróides sexuais; e outras variáveis intrínsecas como a adiposidade, a resistência a insulina e a inflamação crónica (9).

4.3. Alterações dos genes no cancro

Os genes podem sofrer vários tipos de alterações, que incluem: mutações, inserções, duplicações, deleções, translocações e inversões. É preciso mais de uma mutação genética para que uma célula adquira malignidade. Existem 3 tipos principais de genes que controlam

o crescimento celular e podem causar o desenvolvimento do cancro quando sofrem mutações (Fig.3) (7). São estes:

Oncogenes

São genes mutantes que fazem com que as células cresçam de forma descontrolada. Os proto-oncogenes são genes normais que controlam o crescimento celular, mas se eles sofrerem mutação, podem transformar-se em oncogenes. Um proto-oncogene geralmente está desativado, sendo ativado quando está a dizer a uma célula para crescer ou dividir. Ao contrário, os oncogenes estão sempre ativados - portanto, as células crescem descontroladamente (7).

Genes supressores de tumores

São genes normais que retardam o crescimento e a divisão celular, reparam erros no ADN e dizem às células quando morrer. Ajudam a proteger-nos contra o cancro. Os genes supressores de tumor funcionam corretamente quando ativados. Mas, quando esses genes sofrem mutação, são desativados. Isto faz com que as células cresçam de forma descontrolada (7).

Genes de reparação de ADN

Corrigem erros noutros genes que podem ocorrer quando o ADN é copiado. Quando estes sofrem mutação, não podem corrigir erros presentes nos oncogenes e/ou nos genes supressores de tumores, e isto pode levar ao desenvolvimento de cancro (7).

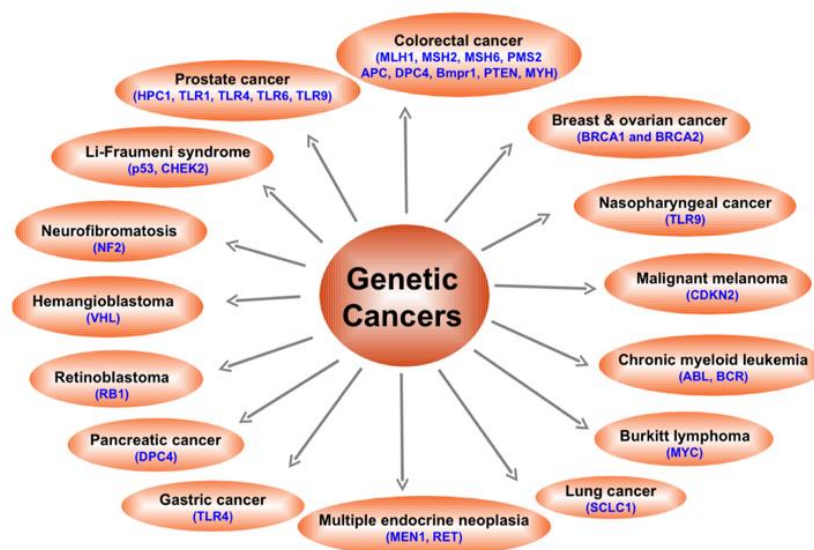


Fig.3 - Genes associados ao risco de diferentes tipos de cancro (9)

4.4. A carcinogénese e as células cancerígenas

A nível celular, a carcinogénese é vista como um processo de várias etapas envolvendo a alteração de células normais que gradualmente progredem para a malignidade, com capacidade crescente de proliferação, sobrevivência, invasão e metástase (Fig.4). A primeira etapa do processo, a iniciação, é o resultado de uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma única célula. A segunda etapa é a proliferação celular, que leva ao crescimento de uma população de células tumorais clonalmente derivadas. Por último, a progressão continua à medida que mutações adicionais ocorrem (4).

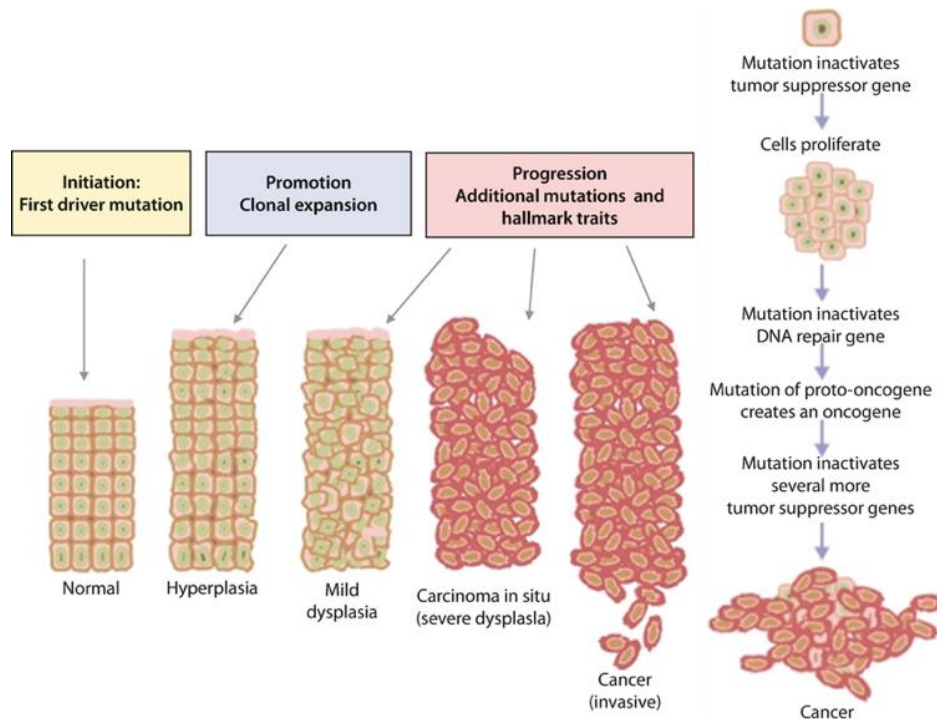


Fig.4 - O processo cancerígeno: iniciação, proliferação e progressão da malignidade (6)

As células cancerígenas diferenciam-se das células normais por serem menos especializadas. Enquanto as células normais amadurecem em tipos celulares muito distintos com funções específicas, as células cancerígenas não (5). Além disto, são capazes de ignorar os sinais que normalmente dizem às células para pararem de se dividir - a inibição dependente da densidade e a inibição de contato célula-a-célula, ou que iniciam um processo conhecido como morte celular programada, ou apoptose, que o corpo utiliza para livrar-se das células desnecessárias (4,5).

Outra característica fulcral é que podem adquirir a capacidade de replicação ilimitada como resultado da expressão de altos níveis de telomerase, permitindo-lhes manter as extremidades dos seus cromossomas, os telómeros, por um número indefinido de divisões (4). Também produzem fatores de crescimento que estimulam sua própria proliferação e secretam proteases que facilitam a invasão dos tecidos adjacentes (4). Possuem a

capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos - a angiogénese, que vão fornecer oxigénio e nutrientes ao tumor, eliminar os seus produtos de degradação e promover a metástase. Algumas conseguem evadir o sistema imunológico e usá-lo para o seu benefício (4,5).

As mudanças na forma manifestam-se como desvios do tamanho, formato e orientação normais das células (6). As células malignas são menos adesivas e mais arredondadas, em parte porque estão menos firmemente ligadas à matriz extracelular ou às células vizinhas (4). As primeiras aberrações são conhecidas como displasia e tornam-se progressivamente mais pronunciadas, de leve a grave, até que possuem todas as características morfológicas de uma neoplasia maligna, sendo a mais comum a heterogeneidade célula-a-célula (6).

Deste modo, ao longo do tempo, vão-se formando massas de células doentes que não desempenham as suas funções originais: os tumores (8). Estas proliferações anormais podem ser benignas ou malignas. Um tumor benigno, permanece confinado à sua localização original, não invadindo o tecido normal circundante nem se espalhando para locais distantes do corpo. Um tumor maligno, no entanto, é capaz de invadir o tecido normal circundante e metastatizar. Apenas os tumores malignos são apropriadamente chamados de cancro (4). Como veremos a seguir, existe uma área circundante a um tumor, sustentada por uma população heterogénea de células, que é conhecida como o microambiente tumoral.

5. O microambiente tumoral

5.1. O que é o microambiente tumoral?

O conceito de microambiente tumoral (TME) foi indiretamente proposto em 1889 por Stephen Page na teoria da "semente e solo", apontando que as metástases do cancro requerem a disseminação de células cancerígenas (a "semente") e uma afinidade especial para o ambiente que estimula o crescimento de órgãos específicos (o "solo") (11). Como todos os processos evolutivos, a evolução do tumor é moldada pelo meio (12). Hoje sabemos que o TME é o ambiente celular no qual o tumor existe (13) e que desempenha funções múltiplas, não apenas na metastização e crescimento, mas também no metabolismo e progressão do cancro (11). Resumidamente, é definido como o espaço onde fibroblastos associados ao cancro, células imunológicas, moléculas sinalizadoras, matriz extracelular e vasculatura co-existem com células tumorais (Fig.5) (14,15). Certamente, é um conceito de elevada complexidade estudado na actualidade pelo papel que desempenha na carcinogénese e na resistência à terapêutica anti-cancerígena.

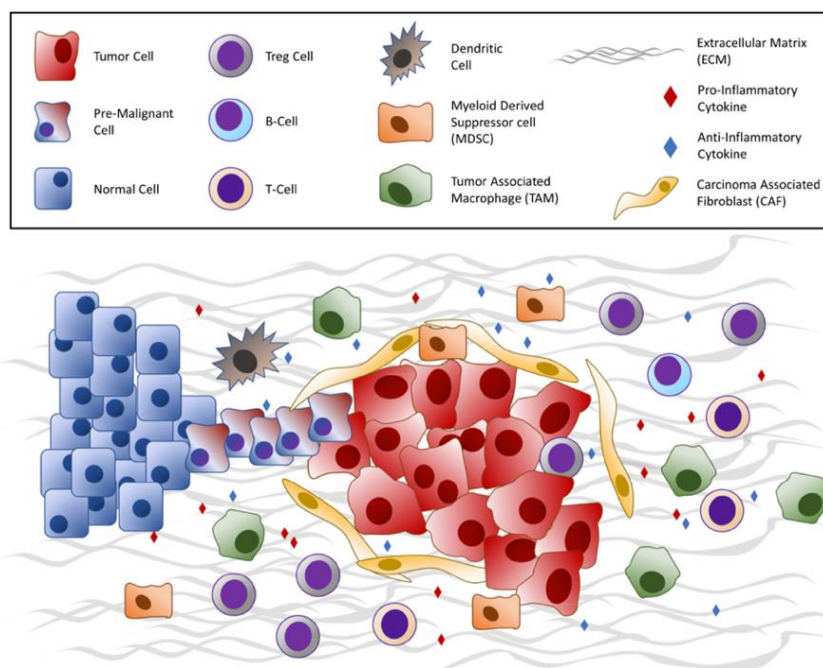


Fig.5 - O microambiente tumoral (14)

5.2. Quais são os constituintes do microambiente tumoral (TME) e o seu papel na doença oncológica?

5.2.1. Constituintes celulares

5.2.1.1. Células cancerígenas

A maioria das células cancerígenas são consideradas como diferenciadas - isto é, incapazes de regenerar um tumor por si mesmas ou metastatizar - constituindo a maior parte da massa tumoral. Infiltradas entre elas, uma pequena percentagem, geralmente de 1–2% do total, exibe características de células estaminais. As células estaminais são células não especializadas que dão início às linhagens celulares porque são as responsáveis por originar células especializadas. Na biologia do cancro, as células estaminais cancerígenas (CSC) são consideradas de maior risco devido à sua capacidade de autorrenovação, iniciação tumoral *in vivo* e invasão para outros tecidos. Em adição, são as únicas células do TME capazes de gerar células tumorais com características diferentes. Assim, os tumores podem surgir devido a mutações que ocorrem em células estaminais normais ou de células diferenciadas que adquirem características semelhantes às das células estaminais (16).

5.2.1.2. Células do estroma

Os tumores sólidos têm uma estrutura que mimetiza os tecidos normais e compreende dois compartimentos distintos, mas interdependentes: o parênquima (células neoplásicas) e o estroma (células não malignas) que as células cancerígenas induzem e no qual estão

dispersas (17). As células tumorais recrutam células de suporte do estroma do tecido endógeno próximo para promover etapas críticas na formação do tumor e, como tal, constituem um componente importante do TME. A composição das células estromais pode variar significativamente entre os tipos de tumor (18). Em tumores sólidos, o estroma inclui tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e, muitas vezes, células inflamatórias (17). Uma vez recrutadas para o TME, secretam muitos fatores que influenciam a angiogênese, proliferação, invasão e a metastização (18).

Fibroblastos associados ao cancro (CAFs)

Entre as células estromais encontradas no TME, os fibroblastos destacam-se (19). São um grupo celular heterogêneo cujas funções foram pirateadas pelas células cancerígenas e redirecionadas para a carcinogênese (20). Uma subpopulação de fibroblastos com fenótipo miofibroblástico em tumores é distinguida como CAFs (Fig.6) (21). Embora estas células sejam frequentemente derivadas de fibroblastos residentes do tecido, elas podem ser diversas em origem, decorrentes de células como adipócitos, células endoteliais, pericitos, células estreladas e células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea (18).


Cell Type	Sub-Type	Functions
 Cancer-Assoc. Fibroblastic Cells	α SMA ⁺ Myofibroblasts & MSCs	Pro-angiogenic, pro-invasive; support cancer stem cells
	Activated Tissue Fibroblasts	Mitogenic, pro-survival, pro-angiogenic, recruit/activate IICs, pro-invasive, pro-metastatic, metabolic support
	Activated Adipocytes	Recruit/activate IICs, metabolic support, pro-metastatic

Fig.6 - Diferentes sub-tipos de CAFs e as suas funções no TME (22)

Em comparação com os fibroblastos normais, os CAFs superexpressam marcadores associados a características malignas, tais como os receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRs), a proteína de ativação de fibroblastos ligada à membrana - a gelatinase, o FAP- α , a α -SMA e a vimentina (11). No TME, as células tumorais e do estroma secretam fatores como TGF- β , PGDF e FGF2 para converter fibroblastos em CAFs. Os CAFs moldam o TME de quatro formas principais: proliferação e metastização tumoral, neoangiogênese, remodelação física da matriz extracelular e imunossupressão. Em tumores de origem epitelial, a transição epitelial-mesenquimal é uma etapa crítica na metastização, na qual as células epiteliais perdem a polaridade celular e as adesões célula-a-célula, ganhando fenótipos migratórios e invasivos. Uma forma de controlarem este processo é por meio da secreção de TGF- β , que é necessário para a transição epitelial-mesenquimal e a angiogênese. Para facilitar a migração das células malignas, os CAFs secretam MMP-3, que

degrada a caderina-E para promover a invasão (18). Os fibroblastos tanto sintetizam quanto degradam componentes da matriz extracelular (20), sendo que, a sua remodelação por parte dos CAFs pode levar a níveis elevados de rigidez do tecido tumoral (12). A matriz extracelular é uma fonte importante do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que pode ser libertado pela MMP-13 para promover a angiogénese (18). Também influenciam o crescimento, a progressão tumoral e promovem a imunossupressão por meio da produção de quimiocinas e citocinas imunomoduladoras, como o VEGFA, o CXCL12 e a IL-6 (11,18).

Células endoteliais (ECs)

O endotélio vascular é uma monocamada fina de células endoteliais que ajudam a orquestrar a formação dos vasos sanguíneos (18). O endotélio não só separa o sangue circulante dos tecidos, como também fornece oxigénio, nutrientes e medicamentos ao tumor. Para além disso, é uma rota de saída para produtos residuais metabólicos e células metastáticas (Fig.7) (12,18).


Cell Type	Sub-Type	Functions
 Endothelial Cells	Endothelial Tip, Stalk, Tube Cells	<ul style="list-style-type: none"> Angiogenesis for blood supply of oxygen & nutrients Produce paracrine trophic factors; recruit IICs Modulate cancer cell dissemination & seeding Limit CTL and NK/T cell inflammation

Fig.7 - Funções das células endoteliais no TME (22)

Durante os estádios iniciais do desenvolvimento tumoral, as células cancerígenas dependem da difusão passiva para as trocas gasosas e o transporte de nutrientes. Quando os tumores atingem 1-2 mm³ de diâmetro, uma concentração de oxigénio insuficiente e um acúmulo de resíduos, o meio torna-se hipóxico e ácido. Para superar isto, os tumores desenvolvem o seu próprio suprimento sanguíneo, levando à ativação de HIFs. Especificamente, estes fatores iniciam o brotamento dos vasos, instruindo as células endoteliais a secretar fatores pró-angiogénicos, como PDGF, EGF e VEGF, principalmente por meio da ativação das vias Akt e NF-κB (11,18). De forma autócrina e parácrina, o VEGF estimula a migração de células endoteliais para formar novos lúmens de vasos. Em seguida, secretam proteínas para formar novas membranas basais. Os vasos sanguíneos no TME frequentemente não conseguem atingir os estádios finais de maturação, resultando no vazamento da vasculatura. As células endoteliais também são críticas na promoção da migração, invasão e metastização de células malignas. Durante a progressão do tumor, as células endoteliais sofrem EMT para tornar-se CAFs (18).

Células estaminais mesenquimais (MSCs)

As MSCs são compostas principalmente por células do estroma que residem em tecidos mesenquimais, como medula óssea, cartilagem e tecidos adiposos. Podem diferenciar-se em vários tipos de células, incluindo osteócitos, condrócitos e adipócitos. Também, formam o nicho pré-metastático para células tumorais que podem promover a quiescência das células cancerígenas e a resistência medicamentosa. Mais recentemente, foi demonstrado que migram em direção aos locais inflamatórios e se incorporam no tumor. O *crosstalk* entre MSCs e células tumorais em vários estádios da progressão do cancro é crucial para a metastização do tumor e promoção da EMT. Foi relatado que exossomas derivados de células malignas desencadeiam o crescimento do tumor por meio da indução da diferenciação de MSCs em miofibroblastos pela ativação da via de sinalização SMAD (11). As MSCs são classificadas como polimorfonucleares (PMN)-MSCs ou monocíticas (M)-MSCs, refletindo as suas semelhanças com neutrófilos e monócitos, respetivamente. Em geral, (M)-MSCs e (PMN)-MSCs são explicitamente promotoras tumorais (14).

Células estreladas

São células quiescentes do estroma de origem mesenquimal localizadas no fígado e no pâncreas. Após a lesão do tecido, tornam-se ativas, entram no ciclo celular e são induzidas a transformar-se em miofibroblastos. As células estreladas hepáticas estão normalmente localizadas nas áreas perisinusoidal e portal do fígado e podem constituir até 15% da massa hepática. O carcinoma hepatocelular é a forma predominante de cancro de fígado e as células estreladas hepáticas funcionam para promover a diafonia no seu TME. Uma molécula de sinalização chave, TGF- β , é produzida por carcinomas hepatocelulares e ativa estas células, que modificam a matriz extracelular e produzem fatores pró-angiogénicos como VEGF e MMP-2. As gotículas lipídicas são estruturas críticas que são usadas para produzir nova matriz extracelular e remodelá-la por meio da produção de MMPs. O adenocarcinoma ductal pancreático é a forma mais comum de cancro pancreático, caracterizado pelo seu tecido fibrótico denso, conhecido como desmoplasia. Quando as células estreladas pancreáticas estão adormecidas, elas contribuem para a modificação da matriz extracelular por meio da produção de proteínas como desmina e vimentina e enzimas de degradação. Ativadas, desempenham um papel crítico na promoção do fenótipo desmoplásico e um microambiente hipóxico (18).

5.2.1.3. Células imunológicas

As células imunes são componentes críticos do microambiente do tumor. Dependendo do contexto, existe uma dicotomia na relação entre as células imunológicas e o TME: podem suprimir o crescimento tumoral ou promovê-lo (Fig.8). Em termos gerais, enquadram-se em duas categorias: células imunes adaptativas e células imunes inatas. A imunidade adaptativa é ativada pela exposição a antígenios específicos e usa a memória imunológica para "avaliar" a ameaça e aumentar as respostas imunológicas. Células T, células B e células natural killer (NK) pertencem à resposta imune adaptativa. A imunidade inata é um mecanismo de defesa não específico que entra em ação horas depois de um antígeno estranho entrar no corpo. As células que executam uma resposta imune inata incluem macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (18). Principalmente numa fase inicial do cancro, a resposta imune produzida pelas células imunológicas no TME possui características anti-tumorais (11). O microambiente imunológico ajuda as células cancerígenas a selecionar as células dominantes para que o tumor possa progredir mais rapidamente em um ambiente limitado (23). Com a progressão da malignidade, o TME vai passar a possuir uma miríade de células imunes pró-tumorais, que são as partes essenciais que moldam a supressão imunológica do ambiente, possibilitando a sobrevivência das células tumorais e a metastização, promovendo ainda a evasão da destruição imunológica (11).

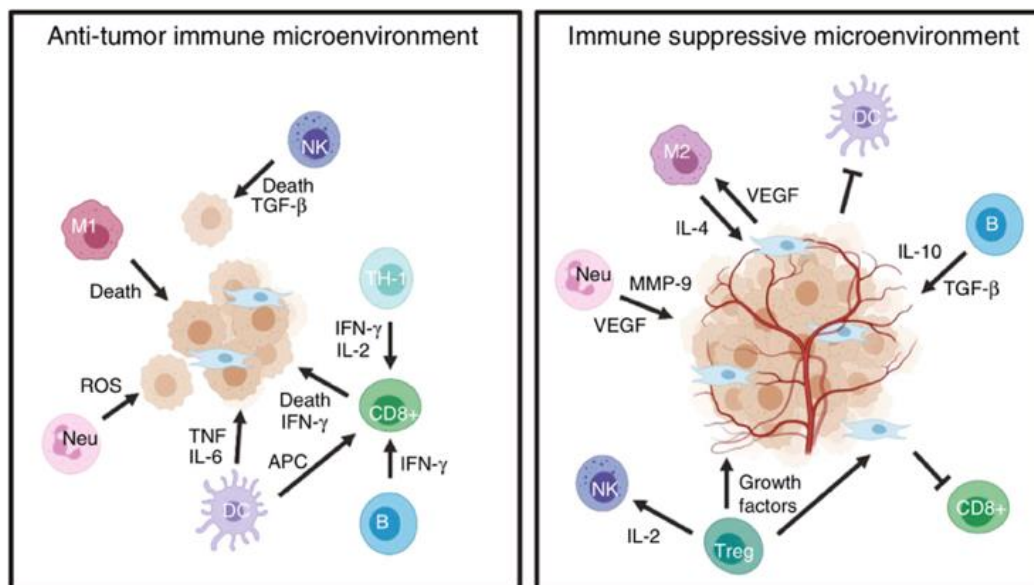


Fig.8 - O Impacto das células imunes no microambiente tumoral (18)

Células T

Dentro do TME, existem populações distintas de células T que influenciam a tumorigênese (18), induzindo atividades anti-tumorais e pró-tumorais (19). As células T citotóxicas CD8+

detetam antígenos tumorais e os direcionam para destruição. Além de matar células tumorais, também suprimem a angiogénese por meio da secreção de interferão gama (IFN- γ). As células T CD4+ diferenciam-se em uma variedade de subtipos e, portanto, coordenam uma ampla gama de respostas imunes dentro do TME. As células T auxiliares 1 (Th-1) são células T CD4+ pró-inflamatórias que suportam as células CD8+ por meio da secreção de IL-2 e IFN- γ . As células T reguladoras (Tregs) normalmente são necessárias para suprimir as respostas inflamatórias e controlar a autoimunidade (18). São atraídas para o TME por quimiocinas, como CCL28-CCR10 e CXCL12-CXCR4 (19).

No contexto do TME, as Tregs são omnipresentes e promovem o desenvolvimento e a progressão do tumor atenuando as respostas imunes anti-tumorais. Por exemplo, secretam IL-2, que modula a homeostase e a função das células NK (18). Também suprimem a resposta dos linfócitos T CD8+ contra as células tumorais por secreção de IL-10, IL-35 e TGF- β e favorecem a indução da expressão de PD-L1 em células tumorais, bloqueando a proliferação e/ou mesmo induzindo a apoptose de células T (19). Além disto, apoiam diretamente a sobrevivência das células cancerígenas por meio da secreção de fatores de crescimento e indiretamente por meio da interação com células do estroma, como fibroblastos e células endoteliais. Num tumor, as células imunes (como as células T citotóxicas) são distribuídas homoganeamente, indicando uma resposta imunológica ativa. Alternativamente, alguns tumores são classificados como excluídos da imunidade; nesses casos, as células T estão localizadas apenas na periferia do tumor e não infiltraram o microambiente tumoral. Finalmente, alguns tumores são categorizados como "imuno silenciosos" e carecem completamente de infiltrados de células imunes, indicando que não há resposta imune ao tumor (18).

Células B

As células B são responsáveis pela produção de anticorpos, apresentação de antígenos e secreção de citocinas. Normalmente, concentram-se na margem dos tumores e são comumente encontradas em nódulos linfático próximos do TME. Em comparação com as células T, relativamente poucas células B infiltrantes são encontradas no TME. Estas células são importantes na formação de "estruturas linfoides terciárias", que são estruturas ectópicas formadas dentro do TME e permitem uma associação próxima entre as células T e B. Semelhante ao que é visto com as Tregs, as células B reguladoras promovem a agressão do tumor por meio da produção de citocinas, incluindo IL-10 e TGF- β , que promovem fenótipos imunossupressores em macrófagos, neutrófilos e células T citotóxicas (18).

Células *natural killer* (NK)

As células *natural killer* normalmente patrulham a corrente sanguínea, procurando células hospedeiras infectadas por vírus e células tumorais. Funcionalmente, as células NK podem ser divididas em duas classes, aquelas que participam diretamente da morte de células malignas mediada por células e aquelas que secretam citocinas inflamatórias. São altamente eficientes em matar células cancerígenas dentro da circulação e podem participar no bloqueio da metastização, mas são menos eficientes para combater dentro do TME (18).

Macrófagos

Os macrófagos são componentes críticos do sistema imune inato que modulam as respostas imunológicas por meio da fagocitose do agente patogénico e da apresentação de antígenos. Além do mais, são essenciais na cicatrização de feridas e reparação de tecidos (18). É fundamental destacar que os macrófagos estão presentes em todos os tecidos e na corrente sanguínea são evidenciados como monócitos (19). Os macrófagos derivados de monócitos podem ser categorizados como macrófagos M1 - inflamatórios, que fagocitam e matam células, ou macrófagos M2 - imunossupressores, que participam na cura de feridas. Embora ambas as classes de macrófagos possam ser encontradas dentro de um tumor, o TME promove o fenótipo M2, conhecidos também como macrófagos associados ao cancro (TAMs), por meio da hipóxia e da secreção de citocinas, como a IL-4, IL-10 e IL-13 para apoiar o crescimento e a progressão tumoral (18,19). Também são recrutados para o tumor como uma resposta à inflamação associada ao cancro (24). Certos tipos de tumor podem ser fortemente infiltrados com macrófagos, que podem compreender até 50% da massa de um tumor. Frequentemente, circundam os vasos sanguíneos no TME, onde secretam o VEGF e induzem a formação de novos vasos sanguíneos (18).

Neutrófilos

Os neutrófilos constituem até 70% dos leucócitos circulantes e fornecem a primeira linha de defesa contra muitos agentes patogénicos. No contexto do cancro, podem atuar para suprimir ou promover o crescimento do tumor, dependendo do tipo e do estadió de desenvolvimento. Conforme um tumor começa a crescer, os neutrófilos N1 - inibição tumoral, são recrutados para o TME e promovem a inflamação por meio da libertação de citocinas e espécies reativas de oxigénio que promovem a apoptose das células tumorais. Posteriormente no desenvolvimento do tumor, os neutrófilos N2 - promoção tumoral, promovem o seu crescimento por meio da modificação da matriz extracelular, libertando VEGF e MMP-9 para estimular a angiogénese e, em última análise, a progressão do tumor e a invasão (18).

Células dendríticas (DCs)

As células dendríticas desempenham um papel crítico no sistema imunológico. Reconhecem, capturam e apresentam antígenos às células T em órgãos linfóides secundários (como os nódulos linfáticos). Preenchem uma lacuna entre a imunidade adaptativa e inata para iniciar as respostas das células T específicas do agente patogénico. São inerentemente programadas para ter uma função anti-tumorigénica no corpo, mas o TME pode cooptar as células dendríticas para apoiar a progressão do tumor. Especificamente, as citocinas secretadas acionam as células dendríticas para tolerar a presença de células tumorais e bloquear a indução de uma resposta imune (18).

Células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs)

Representam um grupo heterogéneo de células mieloides imaturas (19), incluindo granulócitos prematuros, macrófagos, células dendríticas e precursores mieloides (11), com potencial imunossupressor das células T e NK (11,19). Esta imunossupressão está relacionada com a indução da via da arginase, na qual a enzima arginase-1 pode gerar espécies reativas de oxigénio e nitrogénio, como o óxido nítrico. A indução desta via leva à depleção de vários aminoácidos e também aumenta a expressão da proteína de *checkpoint* imune PD-L1, que impede uma resposta imune efetiva contra o tumor. Além disto, estão associadas à progressão tumoral e neoangiogénese, por meio da secreção do VEGF, HIF-1 e bFGF (19). Diferenciam-se em TAMs sobre condições de hipóxia (11). Foi documentado que as MDSCs são atraídas para o TME por algumas moléculas, em especial pelo fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (19).

5.2.1.4. Outros tipos de células

Outros tipos de células, como adipócitos e células neuroendócrinas, também são considerados como importantes reguladoras no desenvolvimento da doença cancerígena (11).

Adipócitos

O tecido adiposo é considerado como um órgão endócrino e secretador funcional (11). O tecido adiposo compreende dois tipos de células, o tecido adiposo branco (WAT) e os adipócitos (23). Os adipócitos são células especializadas dentro do corpo que regulam o equilíbrio energético e são responsáveis por armazenar o excesso de energia na forma de gordura (18). Participam no crescimento e progressão tumoral, numa relação dinâmica e

recíproca, através da secreção de mais de 50 tipos de citocinas, fatores semelhantes a hormonas, quimiocinas e reprogramando um microambiente pró-inflamatório (Fig.9) (18,25).

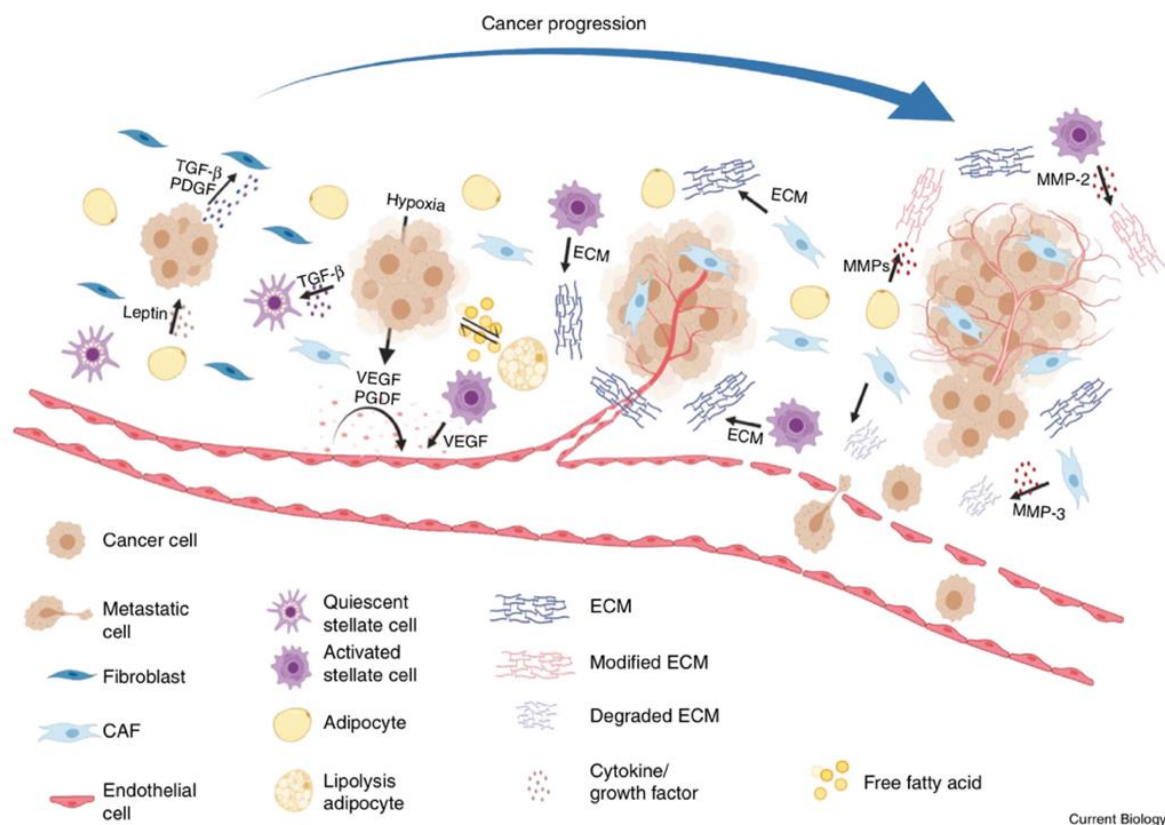


Fig.9 - Interações entre os adipócitos e as células estromais presentes no TME (18)

Estes fatores, cuja produção pode aumentar na obesidade, podem ser cúmplices da iniciação tumoral (26). O tecido mamário é amplamente composto de WAT, portanto, são um jogador crítico no TME do cancro da mama. As células malignas da mama podem estimular os adipócitos a sofrerem lipólise, que quebra os stocks de lípidos, tornando os ácidos gordos livres disponíveis para serem absorvidos pelas células cancerígenas, que os utilizam para a produção de energia, a formação da membrana celular, moléculas bioativas lipídicas e exossomas. A leptina é uma hormona importante produzida pelos adipócitos que promove a progressão tumoral diretamente, por influenciar a proliferação de células do cancro da mama, e indiretamente, pela ativação de macrófagos. Os adipócitos também desempenham um papel importante na modificação da matriz extracelular por meio da secreção de metaloproteases, como MMP-1, MMP-7, MMP-10, MMP-11 e MMP-14. O tecido adiposo pode promover a metastização, por exemplo de células malignas da mama para o fígado e os pulmões por meio de sinalização parácrina (18).

Células neuroendócrinas (NE)

As células NE estão distribuídas por todo o organismo normal e existem em tecidos incluindo o hipotálamo, glândula pituitária anterior, timo, glândula tiroideia (células secretoras de calcitonina), peito e ilhéus pancreáticos. Em quase todos os tumores exercem a função de pró-proliferação gerando e secretando múltiplos neurotransmissores, tais como: cromogranina A, polipéptido cromofílico e polipéptido vasoativo; eventualmente influenciando e regulando a função do sistema imunológico, como a viabilidade das células NK e a capacidade pró-metástica através destes neurotransmissores (11).

5.2.2. Constituintes extracelulares

Matriz extracelular (EMC)

A matriz extracelular é uma rede tridimensional não celular, composta por uma grande coleção de componentes bioquimicamente distintos, incluindo colágeno, elastina, fibronectina, lamininas, proteoglicanos e outras glicoproteínas e polissacarídeos com diferentes propriedades físicas e bioquímicas (11,13).

Não só pode fornecer um suporte físico para todas as células no TME, mas também uma abundância de fatores de crescimento fundamentais (13). Os tumores sólidos contêm grandes depósitos de EMC que constituem até 60% da massa tumoral. Grandes depósitos de colagénio, juntamente com uma alta porcentagem de infiltração de fibroblastos, resultam em desmoplasia. Muitas células dentro do TME secretam componentes da EMC, embora os CAFs sejam a fonte predominante. As MMPs são proteases que quebram as proteínas da EMC e são críticas na sua remodelação para promover a progressão tumoral e a metastização (18). *In vitro*, um modelo 3D indicou que a heterogeneidade da ECM é crucial para controlar comportamentos invasivos de células coletivas (27). Também serve como depósito de citocinas e fatores de crescimento, que são libertados por proteases. Por exemplo, a matriz extracelular pode ser um depósito para fatores pró-angiogénicos, como VEGF, FGF, PDGF, TGF- β (18).

Considerando as suas propriedades físicas, a ECM tumoral é mais abundante, mais densa e mais rígida. Estas alterações podem afetar negativamente a resposta à terapia contra o cancro de várias maneiras (Fig.10) (28).

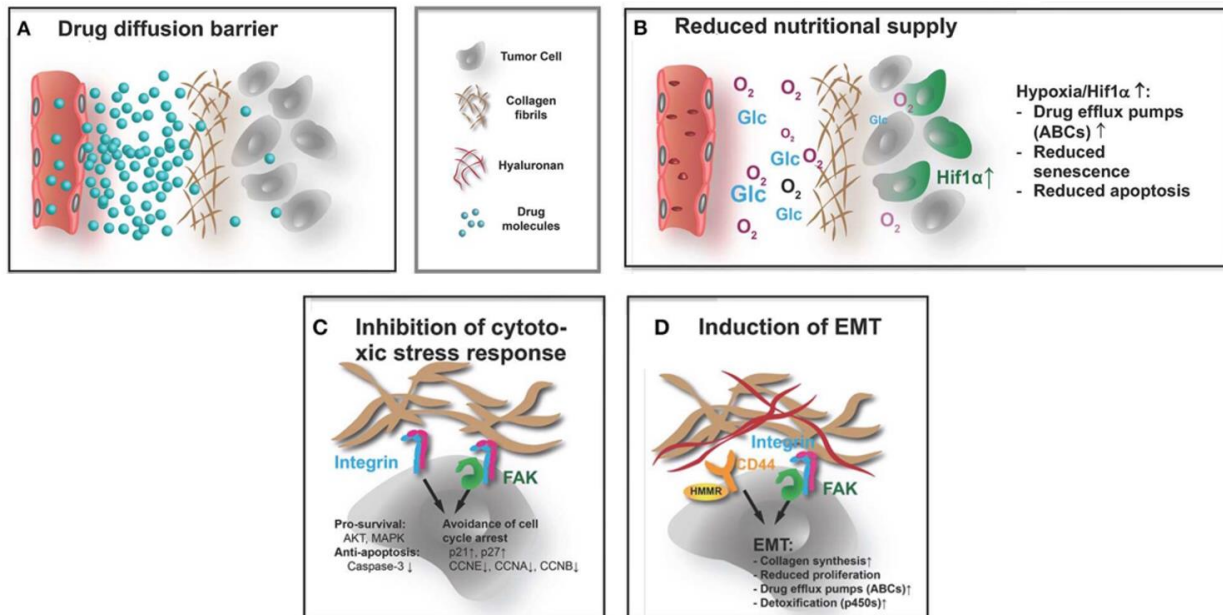


Fig.10 - Como a ECM tumoral afeta a eficácia dos tratamentos sistêmicos: A) Um acúmulo excessivo de ECM, que histologicamente encapsula grupos de células tumorais, pode atuar como uma barreira de difusão, protegendo as células cancerígenas dos agentes terapêuticos. B) Em adição, a barreira prejudica a difusão de oxigênio, nutrientes e metabólitos. O aumento da hipóxia e do *stress* metabólico levam à ativação das vias anti-apoptóticas e de resistências medicamentosas pela expressão aumentada das bombas de efluxo ABCs. C) Os contatos célula-ECM e o aumento da rigidez do tecido podem contribuir diretamente para a quimiorresistência tumoral por meio das vias de sinalização da integrina e FAK. Aumentando a pró-sobrevivência, reduzindo a resposta apoptótica e evitando a paragem do ciclo celular quando confrontadas com danos induzidos pela quimioterapia. D) Finalmente e da mesma forma, os sinais de CD44/HMMR induzidos por hialuronano podem levar à EMT. O estado mesenquimal é caracterizado por traços quimiorresistentes, que incluem, não apenas a regulação positiva dos transportadores ABCs e a proliferação reduzida, mas também a ativação do metabolismo celular (citocromo p450) que melhora a desintoxicação. A EMT também parece aumentar a síntese de colágeno, e a produção de enzimas reticulares nas células tumorais resultando num ciclo vicioso em que a ECM densa induz a EMT que novamente leva ao acúmulo de mais ECM (28).

Vesículas extracelulares (EVs)

São vesículas envolvidas em membrana, incluindo exossomas, microvesículas e corpos apoptóticos, sendo omnipresentes nos tecidos humanos e no sistema de circulação (11). Surgiram como mediadores críticos do *crossstalk* entre o tumor e as células do TME por

transportar várias moléculas biologicamente ativas (Fig.11), que podem promover a iniciação e progressão tumoral (29), bem como regular as principais vias de sinalização no TME (30).

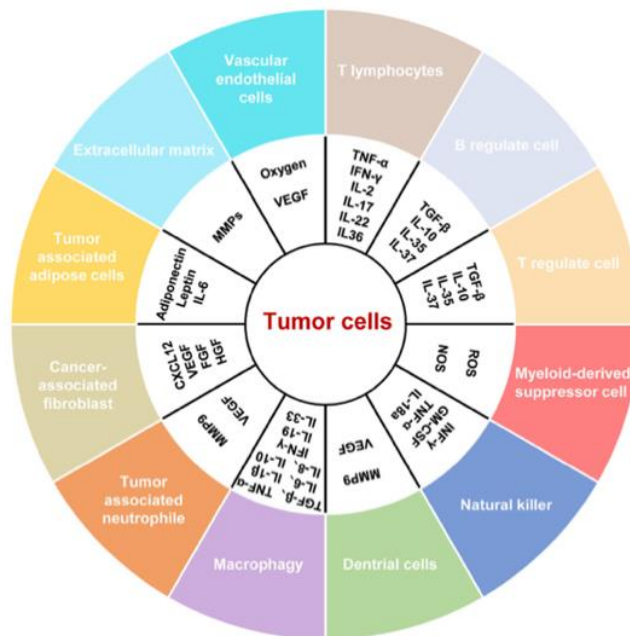


Fig.11 - Moléculas, citocinas e fatores de crescimento celular secretados no TME (35)

Exossomas

São vesículas que variam em tamanho de 30–200 nm. O seu conteúdo reflete as células das quais foram derivados, incluindo proteínas, ARN, ADN e lípidos. Dentro do TME, os exossomas tumorais (TE) desempenham um papel crítico na facilitação do diálogo cruzado entre as células cancerígenas e as células do estroma. Funcionalmente, foi demonstrado que promovem a inflamação, progressão do tumor, angiogénese e metastização (18, 31). Os TE podem induzir a apoptose de células T, ajudando no escape imune de células tumorais (31). As condições de hipóxia parecem exacerbar a produção de exossomas pelas células tumorais e promover a transição das células do estroma em CAFs (18). No entanto, podem estimular células imunes contra o tumor por meio dos seus antigénios endógenos associados ao tumor (TAA). Assim, dependendo da carga e da origem, os TE também podem estimular a resposta imunológica anti-tumoral, abrindo caminho para o uso de exossomas na terapia imunológica (31).

Redes vasculares

As redes vasculares sanguíneas e linfáticas têm papéis diferentes durante os estádios da tumorigénese (23). Elas atuam como pontes que interligam o tumor com o resto corpo. Por um lado, os vasos sanguíneos fornecem oxigénio e nutrientes para o tecido tumoral, eliminam

produtos de degradação e participam na metastização (4,5,11,12,18). Por outro lado, a rede linfática representa mais uma possível rota para a disseminação sistêmica (11). Na progressão tumoral, uma das principais funções destas redes é ajudar as células malignas a escapar da vigilância imunológica. As medidas de fuga são divididas principalmente em duas categorias: diretamente, o microambiente linfático enfraquece ou elimina a função normal das células imunológicas. Por exemplo, as MDSCs e as DCs imaturas nos nódulos linfáticos sentinela (SLNS) podem restringir o funcionamento normal das células T (23). Indiretamente, por meio da remodelação das ECs vasculares que afeta o acesso das células imunológicas aos nódulos linfáticos (11,23).

6. Fatores induzidos no microambiente tumoral envolvidos na carcinogénese e nas resistências terapêuticas

6.1. Acidose e metabolismo alterado

Na década de 1920, Otto Warburg descreveu pela primeira vez o fenómeno no qual as células cancerígenas exibiam um metabolismo alterado, obtendo energia da glicólise a taxas desproporcionalmente altas, em detrimento da fosforilação oxidativa, mesmo em condições aeróbias (efeito de Warburg) (32). E por quê? As células cancerígenas não utilizam a via mais eficiente porque não podem. Uma das primeiras observações sobre a regulação do metabolismo glicolítico no cancro foi que a glicose suprime a respiração e a fosforilação oxidativa das células malignas (efeito de Crabtree). As células tumorais têm um número relativamente pequeno de mitocôndrias com diferentes disfunções, que contribuem para o efeito de Warburg. Se as mitocôndrias estiverem danificadas ou senescentes como resultado da carência em oxigénio e mutações do seu mtADN, as células irão naturalmente procurar outras vias. Curiosamente, a depleção do mtADN está associada ao desenvolvimento de resistências a múltiplos medicamentos (33). A fim de compensar a ineficiência na produção de ATP, as células tumorais aumentam o metabolismo da glicose regulando transportadores e enzimas essenciais. Por meio da glicólise aeróbia, a glicose é convertida em ácido láctico em vez de dióxido de carbono como subproduto (32). O efeito de Warburg, é considerado como sendo um fenótipo metabólico proeminente do cancro (34). A energia também pode ser derivada da via glutaminolítica, onde a glutamina é metabolizada em vez da glicose. De ambas as vias, grandes quantidades de ácido láctico são produzidas e, posteriormente, libertadas no TME. Esta produção excessiva e constante resulta num microambiente ácido. As concentrações de ácido láctico no TME podem ser tão altas quanto 10-30 mM, enquanto a concentração em condições fisiológicas normais é de cerca de 1,5-3,0 mM. O pH pode ser tão baixo quanto 6,0-6,5. O ácido láctico e o microambiente ácido têm efeitos generalizados, estimulando a angiogénese pelo aumento da expressão de VEGF, a invasão local de células

malignas, a metastização e alguns mecanismos chave de escape imunológico, que desarmam as células imunológicas no TME (Fig.12) (32). Este comprometimento pode ser mediado por exossomas tumorais que têm a capacidade de interagir com vários fatores e modificar o fenótipo das células receptoras (31).

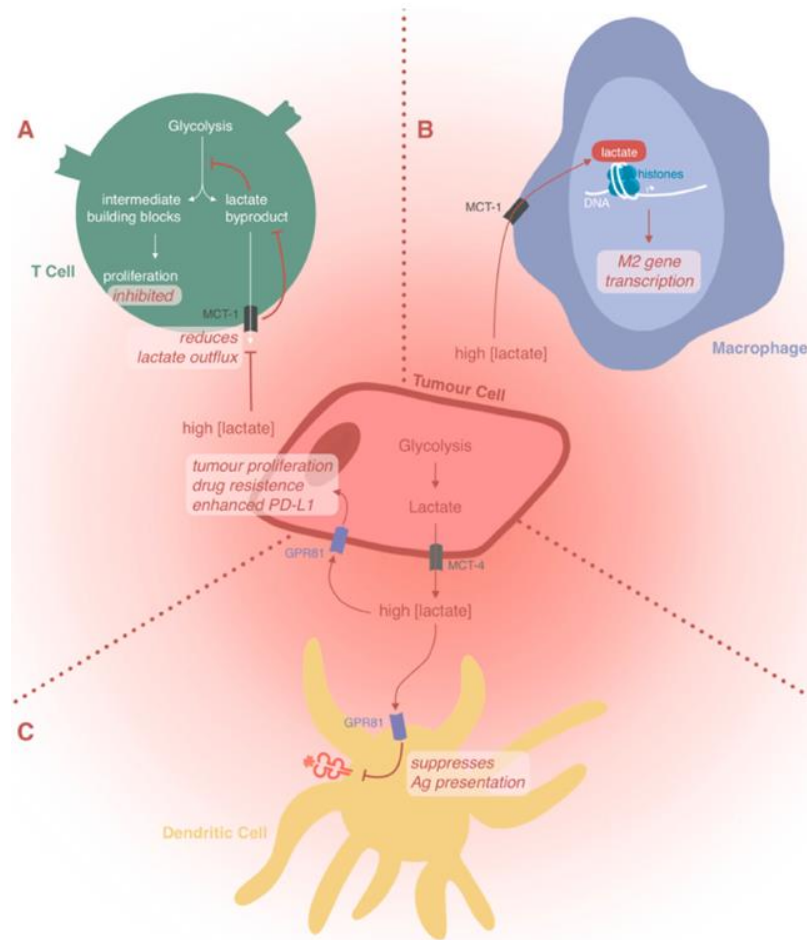


Fig.12 - Mecanismos moleculares pelos quais o ácido láctico modula as respostas das células imunológicas: A) As elevadas concentrações de ácido láctico no TME interrompem o gradiente $[H^+]$ entre as células T e o ambiente, reduzindo a exportação de ácido mediada pelo transportador de monocarboxilato 1 (MCT1) das células T. Isto inibe a proliferação de células T efectoras. B) O ácido láctico atua como um regulador epigenético e induz a polarização de macrófagos M2 por meio da reprogramação epigenética. Liga-se diretamente aos locais de latilação da lisina histona (K1a) para direcionar a transcrição do gene a jusante, induzindo assim a polarização e aumentando as vias biológicas independentes da inflamação. C) Também atua como uma molécula de sinalização. O receptor acoplado à proteína G GPR81 é um receptor de ácido láctico encontrado em células do sistema imunológico e cancerígenas. A sua ativação nestas últimas promove a proliferação, resistência a medicamentos e expressão aprimorada de PD-L1. A sua ativação nas DCs está associada à diminuição dos níveis de cAMP, IL-6, IL-12 e apresentação suprimida de antígenos (32)

6.2. Hipóxia

Durante o desenvolvimento de tumores sólidos, uma grande quantidade de nutrientes e oxigênio é consumida devido à rápida proliferação das células tumorais (35). Quando a taxa de consumo de oxigênio excede a sua taxa de fornecimento pela circulação, a hipóxia desenvolve-se (36). Na presença baixos níveis de oxigênio, que variam entre 1%-2%, podendo ser inferiores (37), as células adaptam-se por meio da via do fator induzível por hipóxia (HIF) (38). O HIF é um fator de transcrição dimérico composto pelas subunidades HIF-1 α ou HIF-2 α e HIF-1 β /ARNT (35). Entre sua miríade de efeitos estimula a glicólise anaeróbia (38) e inibe a respiração mitocondrial (33), uma vez que nestas novas condições com déficit de oxigênio, as células tumorais sofrem reprogramação metabólica com contribuição do oncogene *RAS*, que altera a expressão de proteínas relacionadas com a glicólise, como o transportador GLUT1, as enzimas glicolíticas LDHA e PKF, aumentando a captação de glicose para promover o seu crescimento. Também promove a angiogénese (Fig.13) (33,35).

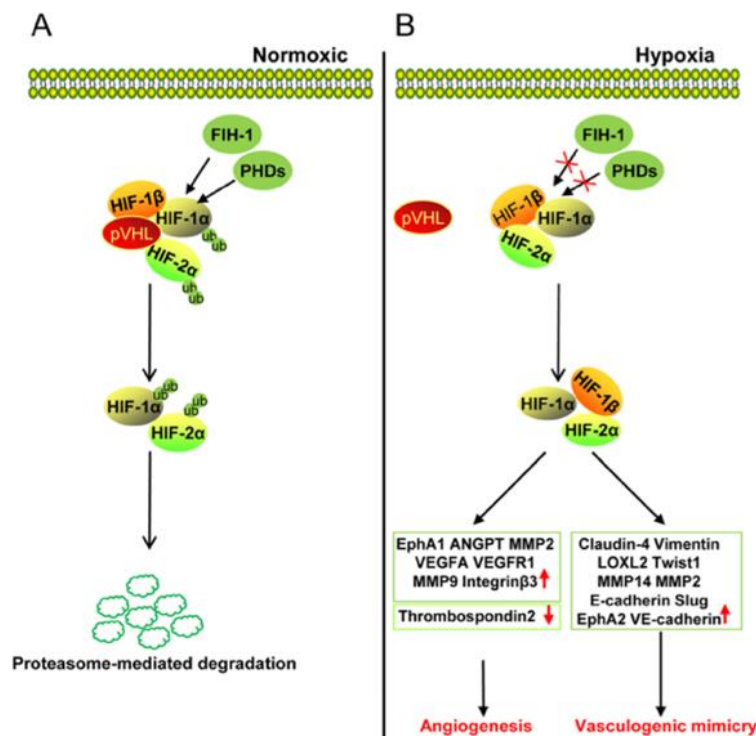


Fig.13 - O papel da hipóxia na angiogénese tumoral: A) Em condições normóxicas, HIF-1 α e HIF-2 α são hidroxilados por PHDs e FIH-1. Posteriormente, o pVHL pode reconhecer e ubiquitinar HIF-1 α /HIF-2 α hidroxilado e degradá-los por meio da degradação mediada por proteossomas. B) Em condições de hipóxia, a inativação de FIH-1 e PHDs impede a hidroxilação de HIF-1 α /HIF-2 α , diminuindo a ligação de HIF α -VHL e promovendo a formação de dímeros de HIF α -HIF β que entram no núcleo para ativar alvos a jusante. HIF-1 α /HIF-2 α pode ativar EphA1, ANGPT, VEGFA, VEGFR1 e outros genes relacionados com a angiogénese. Alternativamente, HIF-1 α /HIF-2 α pode ativar Claudina-4, Vimentina, LOXL2, *Twist1*, VE-caderina para promover mimetismo vasculogénico (35)

Foi demonstrado que a hipóxia leva à resistência e supressão imunológica. Alguns dos efeitos imunossupressores incluem: 1) libertação de moléculas de reconhecimento imunológico por hipóxia tumoral, o que resulta na diminuição da sensibilidade à morte mediada por células T e NK; 2) inibição tanto da maturação de células T e dendríticas como da produção de citocinas; 3) e promoção de células supressoras, como Tregs e TAMs, que bloqueiam as células efetoras do sistema imunológico. Portanto, há uma importância crescente do fenótipo hipóxico das células do estroma e do sistema imunológico no TME, tornando-as como novos potenciais alvos na luta contra o cancro. As células hipóxicas são mais agressivas e invasivas com melhor capacidade de metastizar. Mecanicamente, a hipóxia influencia o comportamento migratório das células cancerígenas pela via da EMT, uma trans-diferenciação das células para adquirir habilidades plásticas e móveis, num processo que altera sua expressão genica antes da migração (37), induzindo a expressão de marcadores, como N-caderina, *slug*, *snail* e vimentina, e aumentando a produção de MMPs que promovem a metastização (35).

6.3. Transição epitelial-mesenquimal (EMT)

A EMT refere-se ao processo pelo qual o fenótipo mesenquimal é adquirido pelas células epiteliais, principalmente através da redução das aderências intracelulares e da capacidade proliferativa. Fisiologicamente, é observado durante a embriogénese, o desenvolvimento de tecidos, a cicatrização de feridas e a carcinogénese. Durante o processo, as células epiteliais passam por uma série de reações bioquímicas que eventualmente levam a alterações na sua morfologia (Fig.14) (39).

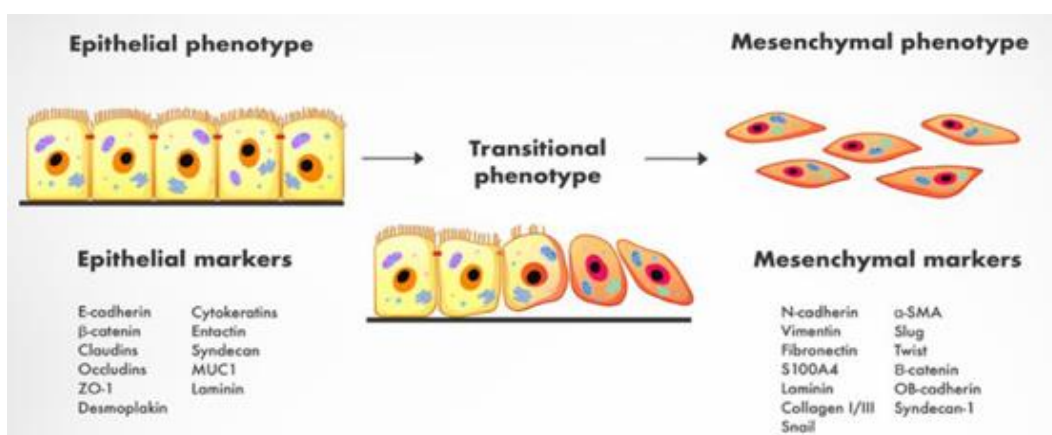


Fig.14 - Transição epitelial-mesenquimal (39)

Existem diferentes indutores da EMT, incluindo o TGF-β, o TNF-α e as vias moleculares Notch, Hedgehog e Wnt. Estes estímulos induzem a transição por meio da regulação positiva de fatores de transcrição, que promovem a perda da polaridade celular destruindo junções

estreitas e degradando moléculas de adesão, como a E-caderina (40). Todo o citoesqueleto sofre reorganização, os contatos célula-a-célula são gradualmente prejudicados, e as células mudam para uma forma mais alongada (39). A resposta móvel das células tumorais está associada à biogénese de vários tipos de projeções celulares, incluindo bolhas, pseudópodes, lamelipódios, filópodes e citonemas. A função destas projeções na migração celular depende criticamente da complexa maquinaria do citoesqueleto. A motilidade e a migração são induzidas por duas formas básicas de estimulação química, isto é, a quimiotaxia (motilidade dirigida induzida) e quimiotaxia (motilidade dirigida induzida) (41). Não só isto, mas também perdem a expressão dos seus marcadores epiteliais característicos, ao adquirir a expressão de proteínas mesenquimais, aumentando a motilidade celular e a capacidade de invadir tecidos circundantes (42). Curiosamente, a EMT é um processo reversível - as células tumorais que obtiveram um fenótipo mesenquimal podem re-adquirir as características epiteliais anteriores (39).

6.4. Angiogénese

Uma característica fundamental do cancro é sua capacidade de estimular a angiogénese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes em resposta a sinais químicos secretados por, uma ferida ou um tumor, por exemplo (43). Os vasos normais exibem um padrão de ramificação organizado e hierárquico de artérias, veias e capilares. Em vasos saudáveis, as células endoteliais são sustentadas pela membrana basal e uma cobertura de pericitos e estão fortemente conectadas por junções célula-a-célula estáveis (Fig.15). Por outro lado, os vasos tumorais exibem uma rede desorganizada caracterizada por ter um fluxo sanguíneo reduzido, onde há ruptura das junções das ECs, perda dos pericitos e aumento do vazamento, resultando no aumento da hipóxia tecidual e intravasamento das células tumorais. Além disto, a membrana basal das ECs tumorais é anormal e de espessura variável (Fig.15) (44). O processo angiogénico é dividido nas seguintes etapas: fatores pró-angiogénicos são inicialmente secretados no líquido extracelular para ativar as ECs. Estas células migram ao longo do gradiente de concentração destes fatores e fixam-se aos vasos sanguíneos para formar uma rede vascular funcional. Os capilares sanguíneos no tecido normal sofrem expansão sobre condições isquémicas ou hipóxicas, resultando num aumento acentuado da permeabilidade capilar e exsudação de fibrina. Simultaneamente, a ativação da colagenase e a rutura da membrana basal podem promover a remodelação da ECM. Além do mais, os fatores angiogénicos induzem a proliferação das ECs, e novas ECs são organizadas em estruturas tubulares para formar novos vasos tumorais (35).

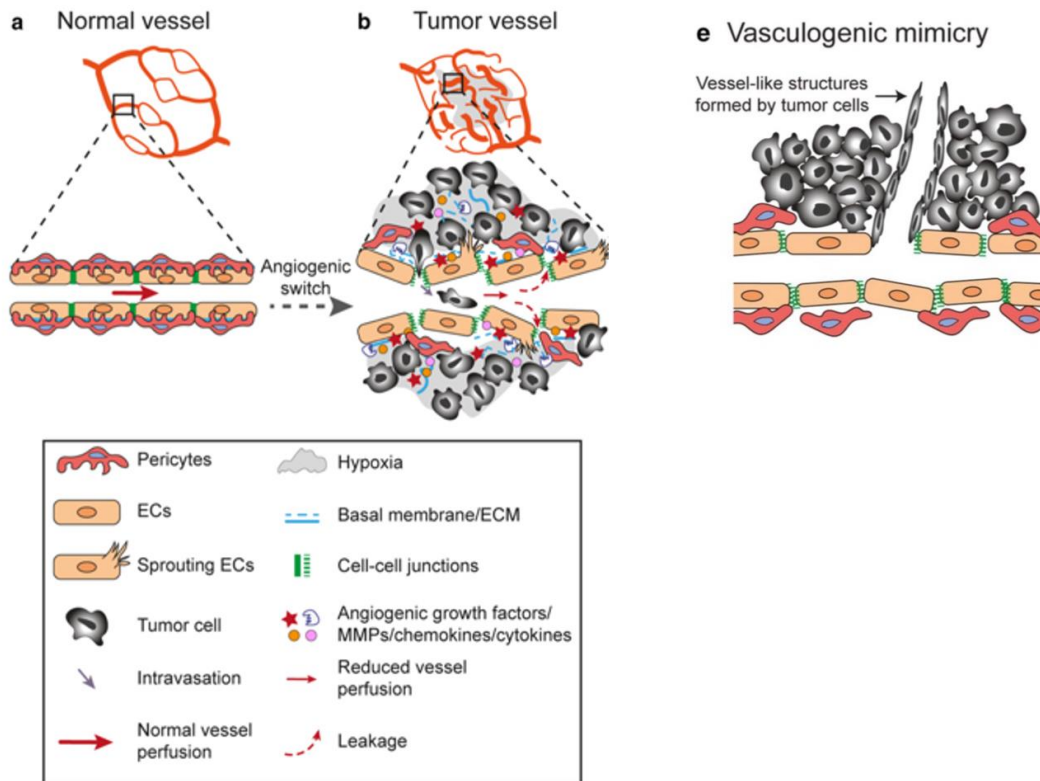


Fig.15 - Comparação entre a vasculatura normal (a) e a tumoral (b); O mimetismo vasculogénico conformado por uma rede de células tumorais (e) (44)

Outra forma de angiogénese encontrada em tumores é o mimetismo vasculogénico (Fig.15). Esta é a capacidade das células tumorais de formarem estruturas tubulares semelhantes às formadas pelas células endoteliais sobre a influência de estímulos externos. Os eritrócitos estão presentes no lúmen destas estruturas tubulares. Além do mais, estes tecidos tubulares podem ligar-se aos vasos sanguíneos endoteliais para formar uma rede vascular completa. O mimetismo vasculogénico pode acelerar a formação de novos vasos sanguíneos (35). Como já foi mencionado previamente, a neovascularização tumoral fornece nutrientes e oxigénio às células tumorais, remove os resíduos metabólicos e promove a metastização (4,5,11,12,18,35). Não só isto, como também é responsável por causar imunossupressão tumoral ao inibir a maturação das DCs e a apresentação de antígenos, o recrutamento de células imunossupressoras e a inibição da atividade de células T citotóxicas. Mesmo assim, a neovascularização do tumor é imatura e a falta de adesão das células murais leva à hiperpermeabilidade vascular do tumor, má perfusão e hipóxia. Já sabemos que aumento da falta de oxigénio acelera ainda mais o crescimento tumoral e o processo de metastização (33,35).

6.5. Metastização

Na maioria das vezes, o cancro metastático não pode ser curado. Por causa disto, a metástase é a principal causa de mortalidade por cancro (mais de 90% dos casos) (45). Apenas recentemente, a atenção foi chamada para o fato de que as células cancerígenas em metástase adaptam selectiva e dinamicamente o seu metabolismo em cada etapa da cascata metastática (Fig.16). Além disto, muitas metástases apresentam características metabólicas diferentes em comparação com os tumores de onde se originam, permitindo a sobrevivência e o crescimento no novo ambiente (46). A metastização é o processo que envolve a translocação de células cancerígenas do TME primário para locais distantes (18). É o teste definitivo da “sobrevivência do mais apto” para as células tumorais, pois apenas uma pequena fração pode superar os inúmeros obstáculos que encontram durante a sua viagem, tais como a morte por células imunológicas, *anoikis* e o *stress* por cisalhamento de fluidos (47).

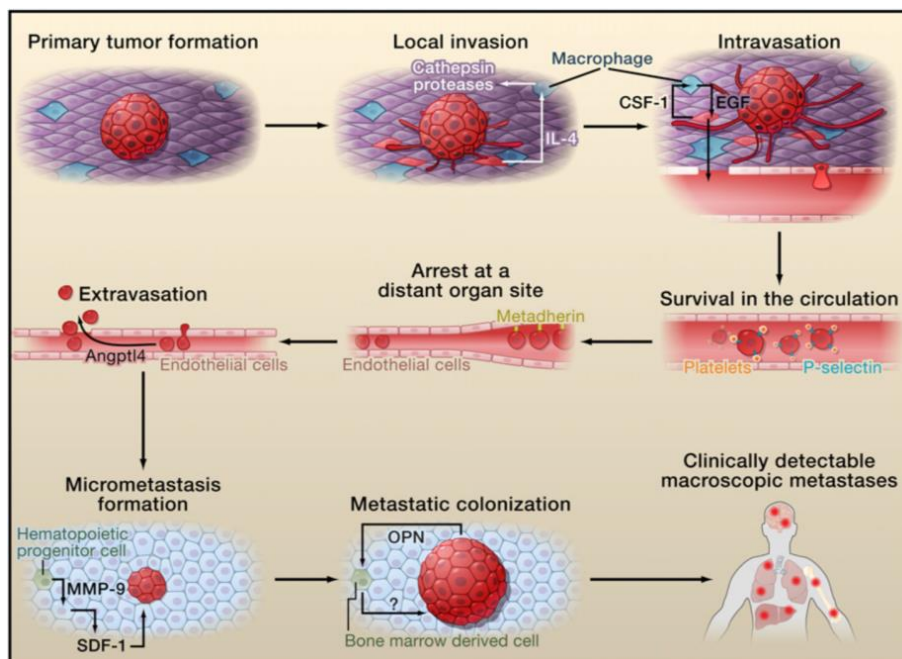


Fig.16 - Principais etapas no processo de metastização e os seus efetores (48)

O processo pode ser segmentado nas seguintes etapas: 1) as células malignas invadem localmente através da matriz extracelular circundante e das camadas de células estromais, 2) intravasam no lúmen dos vasos sanguíneos, 3) sobrevivem aos rigores do transporte através da vasculatura, 4) extravasam para o parênquima de tecidos remotos, 5) sobrevivem nestes microambientes estranhos, a fim de formar micrometástases, e 6) reiniciam os programas proliferativos em locais metastáticos, gerando assim crescimentos neoplásicos macroscópicos, clinicamente detectáveis (a etapa muitas vezes referida como a “colonização metastática”). Muitos destes eventos complexos são orquestrados por vias moleculares que

operam dentro das células do carcinoma. É importante ressaltar que as interações entre as células neoplásicas e as não neoplásicas também desempenham papéis vitais em toda a cascata de invasão-metástase (48). A plasticidade metabólica, isto é, a capacidade de usar diferentes nutrientes (49), não é apenas característica das células malignas, mas também um fenômeno comum em células não malignas. Dentro de um tumor primário em proliferação, esta reconfiguração é direcionada a um programa anabólico para sintetizar proteínas, lipídios e nucleotídeos (50). Ao longo da cascata, o metabolismo pode ajustar-se de acordo com as demandas celulares e adaptar-se para imitar o das células saudáveis ao seu redor (50,51), mecanismo que é conhecido como flexibilidade metabólica, ou seja, a capacidade de processar o mesmo nutriente de maneira diferente (49). Durante a metástase, as células encontram-se na fase do ciclo celular G0/G1 e, como consequência, a demanda de energia para sintetizar macromoléculas é baixa. Na disseminação, o catabolismo de nutrientes não é usado para a proliferação, mas em vez disso, pode ser explorado para sobrevivência e mobilidade celular (50).

A maioria dos carcinomas pode invadir outros órgãos por meio da "invasão coletiva". Alternativamente, as células individuais utilizam o programa de "invasão mesenquimal" dependente de integrinas, proteases e fibras de *stress* ou o programa de "invasão amebóide" dependente de integrinas, proteases, fibras de *stress* e Rho/ROCK (48). Uma vez na circulação, as células tumorais circulantes (CTCs), que viajam como células individuais ou como aglomerados multicelulares, rapidamente se associam às plaquetas, numa interação que é desencadeada pelo Fator Tissular exibido à superfície das CTCs e que contribui para a metastização. Mais especificamente, as plaquetas aderidas podem prevenir o reconhecimento das células tumorais e a lise pelas células NK. Este efeito pode ser mediado por fatores solúveis derivados de plaquetas, incluindo TGF- β e PDGF que inibem a atividade das células NK e, muito possivelmente, protegem-nas fisicamente por meio da formação de capas em torno das CTCs e a deposição de fibrinogênio (52). Em adição, esta associação contribui para o abrigo das forças de cisalhamento (47,48,52).

A perda de contato com os componentes do TME também desencadeia a apoptose, que é denominada *anoikis*. Este fenômeno é induzido pelos receptores de morte celular Fas ou TNFR1 e as vias apoptóticas mediadas por mitocôndrias. Os primeiros ativam a caspase-8, levando à clivagem e ativação da caspase-3. Entretanto, as proteínas BH3, ou seja, Bim e Bad, promovem a ativação do complexo Bax-Bad nas mitocôndrias, e conseqüentemente, ativam as caspases para desencadear a apoptose. No entanto, as células metastáticas desenvolveram uma variedade de vias para resistir a morte celular. O receptor cinase B da tropomiosina (TrkB), é um potente inibidor de *anoikis* e promotor de metastização. As CTCs também se protegem modulando o microambiente. Os tumores regulam o status de ROS no

TME para acionar as vias de pró-sobrevivência de PI3K/PKB α e ERK para promover resistência ao *anoikis*. Além do mais, as células tumorais também escapam do processo recrutando CAFs, que secretam proteínas de ligação ao IGF-1 para estabilizar a proteína anti-apoptótica Mcl-1(47). Quando alojadas na microvasculatura de órgãos distantes, as CTCs podem iniciar o crescimento intraluminal e formar uma microcolônia que eventualmente rompe as paredes dos vasos circundantes, colocando assim as células tumorais em contato direto com o parênquima do tecido. Alternadamente, as células metastáticas podem cruzar o lúmen dos vasos para o parênquima do tecido, penetrando na célula endotelial e nas camadas de pericitos que separam o lúmen dos vasos do microambiente estromal, um processo conhecido como extravasamento. A fim de superar as barreiras físicas dos tecidos com baixa permeabilidade intrínseca, as CTCs secretam fatores que induzem a hiperpermeabilidade vascular, entre os quais: VEGF, Angptl4, EREG, COX-2, MMP-1 e MMP-2, que levam à ruptura das junções célula-a-célula (48).

Por último, a capacidade das células tumorais disseminadas de escapar da dormência e começar a proliferação ativa pode depender de mecanismos celulares não autônomos que são necessários para converter microambientes estranhos em nichos mais hospitaleiros. Por exemplo, o crescimento pode depender da ativação e mobilização para a circulação de células derivadas da medula óssea e do seu recrutamento subsequente para o local metastático; nalguns casos, estes processos podem ser estimulados por sinais sistêmicos como OPN ou SDF-1. É importante ressaltar que, embora uma proporção substancial de células tumorais extravasadas com sucesso não tenha sobrevivido inicialmente nos novos locais para gerar micrometástases, o processo subsequente de colonização é ainda mais ineficiente, talvez em várias ordens de magnitude. Coletivamente, a evidência converge para a conclusão que a colonização metastática frequentemente representa a etapa limitante da cascata de invasão-metástase (48).

7. Aplicações do microambiente tumoral na terapia oncológica

Os tumores são apropriadamente denominados como "feridas que nunca curam" (53). A quimioterapia é a terapia anti-cancerígena líder a nível mundial, frequentemente combinada com cirurgia, ou cirurgia e radioterapia, dependendo do estadió do tumor. Desde a descoberta de várias mutações importantes que contribuem para a carcinogénese (Fig.3), estas têm sido amplamente utilizadas como alvos para o desenvolvimento de medicamentos mais seletivos para combater o cancro. Apesar da sua eficácia, as resistências a múltiplos medicamentos tem aumentado, o que muitas vezes resulta na recidiva do tumor e na baixa qualidade de vida para os doentes. A pesquisa terapêutica tem-se concentrado nas células tumorais, embora

cada vez mais frequentemente o efeito do TME tenha demonstrado desempenhar um papel fundamental na progressão do tumor e nas resistências. Compreender os principais eventos que ocorrem no TME que suportam o crescimento do tumor primário e como impactam a modulação do ambiente é de extrema relevância para auxiliar na definição de terapêuticas eficientes (54).

Um dos objetivos das terapias contra o cancro é eliminar as células transformadas ou, pelo menos, convertê-las num estado não proliferativo inofensivo (12). Dado o potencial de re-educar a natureza do TME em direção a uma imunidade anti-tumoral, nos últimos anos, muitos esforços têm sido dedicados para projetar novas estratégias eficazes capazes de atuar tanto nos componentes imunológicos, como os não imunes do TME (Tabela 1) (55).

Tabela 1 - Algumas estratégias terapêuticas oncológicas com diferentes abordagens que tem em consideração a importância do TME.

Estratégia Terapêutica	Definição
Inibidores do ponto de controlo imunológico (ICIs).	<p>Bloqueio das vias CTLA-4 e PD-1/PD-L1. O bloqueio de CTLA-4 permite a ativação e proliferação de células T específicas de tumor e reduz a imunossupressão mediada pelas Treg. O bloqueio da via PD-1/PD-L1 restabelece a atividade de células T específicas de tumor quiescentes e estimula a migração e proliferação de células T.</p> <p>Tipos de cancro: Melanoma metastático, linfoma de Hodgkin, cancro de pulmão de células não pequenas, carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, carcinoma de células de Merkel, entre outros.</p>
Vacinas contra o cancro, específicas para as DCs.	Uma vez que uma das principais características do TME é a desregulação das DCs, muitas vezes sendo incapazes de sofrer diferenciação, ativação e apresentação de antígenos corretas, as vacinas baseadas em DCs representam uma abordagem terapêutica promissora para estimular a imunidade anti-tumoral. As DCs são colhidas de doentes por leucaferese, maturadas <i>ex vivo</i> e carregadas com antígenos tumorais (tais como: proteínas, ADN, mRNA, lisados ou células tumorais) antes da reinfusão nos doentes. No TME, as DCs

	<p>apresentam os antígenos tumorais as células T específicas de tumor, resultando na ativação e expansão de células T.</p> <p>Dado o forte componente da angiogénese tumoral no escape imunológico ao nível do TME, a combinação destas vacinas com terapias anti-angiogénicas está a ser explorada. Do mesmo modo, muitos estudos estão a desafiar a utilização das vacinas DCs com ICIs com o objetivo de direcionar sinais imunológicos complementares, para melhorar a atividade das células T específicas de tumor que infiltram no TME.</p> <p>Tipos de cancro: Cancro HPV-16+ (vacina ISA101), adenocarcinoma do pâncreas (GVAX-Pancreas NCT00084383), entre outros.</p>
<p>Terapias com células CAR T.</p>	<p>A terapia celular baseada no uso de células T do receptor de antígeno quimérico (CAR), representa o tratamento personalizado mais novo e promissor para doentes com cancro. As células CAR T carregam receptores de fusão construídos modularmente que reconhecem antígenos específicos em células cancerígenas; após a ligação, os domínios de sinalização intracelular induzem cascatas de transdução de sinal estimulando atividades de células T anti-tumorais. Nalguns tumores não sólidos os resultados obtidos foram bastante favoráveis. Infelizmente, o uso desta terapia não alcança resultados igualmente bons para a cura de tumores sólidos, principalmente devido: (i) à complexidade na seleção antígenos específicos para direcionar de forma eficiente as células tumorais, evitando a toxicidade de reatividade cruzada, (ii) dificuldades das células CAR T para penetrar no TME, superando assim as suas características intrínsecas imunossupressoras, e, (iii) a manutenção da eficácia e persistência. A identificação de neo-antígenos alvo únicos é absolutamente necessária para atingir com eficiência as células dentro do TME.</p> <p>Novas células CAR T (CARs duplos ou <i>tandem</i>) foram projetadas para reconhecer dois antígenos ao invés de um, para cobrir melhor a distribuição heterogénea de antígenos cancerígenos. A este respeito, as células CAR T que expressam HER2 e mucina 1 mostraram resultados promissores em estudos pré-clínicos do cancro da mama, enquanto as células CAR T direcionadas a HER2 e IL-13Rα2 foram</p>

	<p>mais eficazes do que as direcionadas a apenas um antígeno num modelo de glioma pré-clínico CD19/CD20. É importante ressaltar que os ensaios clínicos com CAR T duplo direcionado a CD19/CD20 e CD19/CD22 estão atualmente em execução.</p> <p>A combinação com terapias anti-angiogénicas visando VEGF ou outros receptores endoteliais, como CD276 ou endotelina B, pode representar uma boa opção para superar a baixa infiltração das células CAR T no TME. No entanto, a combinação mais eficaz é com ICIs que demonstraram uma melhora significativa da persistência das células CAR T no tumor devido à reversão dos sinais ambientais imunossupressores.</p>
	<p>Tipos de cancro: Leucemia linfoblástica aguda de células B e linfoma, cancro de cólon, melanoma e glioblastoma multiforme, cancro da mama, entre outros.</p>
<p>Nanopartículas transportadoras de medicamentos.</p>	<p>As nanopartículas são vantajosas em relação aos sistemas tradicionais de distribuição medicamentosa. Em primeiro lugar, têm elevada capacidade de ajuste, de modo que podem ser projetadas para diversos tamanhos, formas e funções. Podem ser carregadas com vários medicamentos e modificadas com ligandos celulares específicos (DCs, TAMs, CAFs), alcançando assim a entrega direcionada e simultânea de agentes terapêuticos, protegendo-os da degradação ou agregação, em resposta a estímulos encontrados no TME (pH, hipóxia). Em segundo lugar, tendem a acumular-se no tumor mais do que no tecido normal por causa do vazamento da vasculatura e da drenagem linfática danificada, ou seja, o efeito EPR, o que reduz os efeitos fora do alvo e, conseqüentemente, a toxicidade.</p>
	<p>Tipos de cancro: cancro de próstata, cancro do pâncreas, entre outros.</p>

8. Conclusão

Não há dúvidas que o microambiente tumoral desempenha um papel fundamental desde a carcinogénese até a metastização e o desenvolvimento de resistências terapêuticas nas doenças cancerígenas. A sua composição varia entre os tipos de tumor, mas as

características marcantes incluem células imunes, células do estroma, vasos sanguíneos e matriz extracelular.

Neste nicho dinâmico, as células tumorais conseguem mudar o seu fenótipo e adquirir propriedades funcionais que as tornam progressivamente mais mortais e que são consideradas como *hallmarks* do cancro. Além disso, adaptam-se às novas condições do meio onde estão a proliferar. Com a falta de oxigénio e nutrientes, o seu metabolismo energético altera-se e como consequência o ambiente torna-se ácido e propício para a ocorrência da EMT e da angiogénese. Todos estes fenómenos fomentam as metástases, que são extremamente fatais.

Claramente, o *crosstalk* entre os múltiplos componentes celulares do TME mediado por uma rede complexa de interações célula-a-célula e uma matriz heterogénea de fatores solúveis descreve novas vias de sinalização que devem ser direcionadas. Foi graças à necessidade intrínseca do ser humano de tentar compreender o corpo através da experimentação científica, que muitas destas interações, bem como os seus mecanismos efetores foram melhor compreendidos. No entanto, ainda existem muitas incógnitas que precisam de mais estudos e investigação para ser esclarecidas, nomeadamente, o conhecimento completo do metabolismo tumoral e das suas vias energéticas alternativas, bem como entendermos melhor a extraordinária plasticidade e capacidade de transformação das células malignas; os mecanismos por base da evasão imunológica também são de grande interesse. Na era da medicina personalizada, o conhecimento dos sinais imunossupressores do TME que causam a progressão tumoral e metástase precisam ser melhor definidos para projetar novas e mais eficazes estratégias terapêuticas complementares que também superem as resistências medicamentosas que frequentemente ocorrem. As abordagens mais recentes, incluem terapias combinatórias sinérgicas que visam mudar este panorama e tornar os tratamentos cada vez mais individualizados para as necessidades do doente.

É certo que ainda há um grande caminho pela frente para determinar quais serão os benefícios e os riscos associados ao tratamento de células cancerígenas no contexto do TME, e um ainda maior para achar a “cura do cancro”. Sem preencher as lacunas no conhecimento, é provável que as resistências aos medicamentos oncológicos continuem a ser um problema com risco de vida nestes doentes. Contudo, nada é impossível quando o desejo de mudar o mundo existe.

9. Referências bibliográficas

1. The History Of Cancer - National Cancer Institute [Internet]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html>
2. Alguns tipos de cancro - IPO Lisboa [Internet]. Available from: <https://www.ipolisboa.min-saude.pt/sobre-o-cancro/alguns-tipos-de-cancro/>
3. Portugal Source: Globocan Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site. 2019.
4. Cooper GM HR. The Cell: A Molecular Approach. Sinauer Associates; 2019. 1–820 p.
5. What Is Cancer? - National Cancer Institute [Internet]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#cell-differences>
6. Compton C. Cancer Initiation, Promotion, and Progression and the Acquisition of Key Behavioral Traits. In: Cancer: The Enemy from Within: A Comprehensive Textbook of Cancer's Causes, Complexities and Consequences [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 25–48. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-40651-6_2
7. What is cancer? - Canadian Cancer Society [Internet]. Available from: <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-101/what-is-cancer/?region=qc>
8. O Cancro | CUF [Internet]. Available from: <https://www.cuf.pt/cuf-oncologia/o-cancro>
9. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res.* 2008;25(9):2097–116.
10. Cancer [Internet]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
11. Wei R, Liu S, Zhang S, Min L, Zhu S. Cellular and Extracellular Components in Tumor Microenvironment and Their Application in Early Diagnosis of Cancers. Vol. 2020, Analytical Cellular Pathology. Hindawi Limited; 2020.
12. Hirata E, Sahai E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. 2017; Available from: www.perspectivesinmedicine.org
13. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. Vol. 368, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 7–13.
14. Osipov A, Saung MT, Zheng L, Murphy AG. Small molecule immunomodulation: The tumor microenvironment and overcoming immune escape [Internet]. Vol. 7, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2019. p. 224. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0667-0>
15. Definition of tumor microenvironment - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute [Internet]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor-microenvironment>
16. García-Heredia JM, Carnero A. Role of Mitochondria in Cancer Stem Cell Resistance [Internet]. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32679735/>
17. Connolly JL, Schnitt SJ, Wang HH, Longtine JA, Dvorak A, Dvorak HF. Tumor Structure and Tumor Stroma Generation. 2003; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13447/>
18. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol* [Internet]. 2020;30(16):R921–5. Available from:

<http://www.cell.com/article/S0960982220309337/fulltext>

19. Bettencourt JC, Bussador J, França CN, Luis A, Bachi L, Method F, et al. Non-tumor cells role in the tumor microenvironment (TME) of head and neck cancer (HNC). 2020;1–5.
20. Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2013;1832(7):1070–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.013>
21. Karvonen HM, Lehtonen ST, Sormunen RT, Lappi-Blanco E, Sköld CM, Kaarteenaho RL. Lung cancer-associated myofibroblasts reveal distinctive ultrastructure and function. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2014;9(5):664–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.000000000000149>
22. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment [Internet]. Vol. 21, *Cancer Cell*. Elsevier; 2012. p. 309–22. Available from: <http://www.cell.com/article/S1535610812000827/fulltext>
23. Wang M, Zhao J, Zhang L, Lian Y, Wu Y, Gong Z, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* [Internet]. 2017;8(5):761–73. Available from: <http://www.jcancer.org>
24. Szebeni GJ, Vizler C, Kitajka K, Puskas LG. Inflammation and Cancer: Extra- and Intracellular Determinants of Tumor-Associated Macrophages as Tumor Promoters. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/9294018>
25. Donohoe CL, Ofarrell NJ, Doyle SL, Reynolds J V. The role of obesity in gastrointestinal cancer: Evidence and opinion. *Therap Adv Gastroenterol*. 2014;7(1):38–50.
26. Gilbert CA, Slingerland JM. Cytokines, obesity, and cancer: New insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression [Internet]. Vol. 64, *Annual Review of Medicine*. Annual Reviews; 2013. p. 45–57. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-121211-091527>
27. Zhu J, Liang L, Jiao Y, Liu L. Enhanced invasion of metastatic cancer cells via extracellular matrix interface. *PLoS One*. 2015;10(2):1–17.
28. Henke E, Nandigama R, Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci*. 2020;6(January):1–24.
29. Adamo A, Dal Collo G, Bazzoni R, Krampera M. Role of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in tumour microenvironment. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2019;1871(1):192–8.
30. Wu K, Xing F, Wu SY, Watabe K. Extracellular vesicles as emerging targets in cancer: Recent development from bench to bedside. Vol. 1868, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V.; 2017. p. 538–63.
31. Boussadia Z, Zanetti C, Parolini I. Role of microenvironmental acidity and tumor exosomes in cancer immunomodulation. *Transl Cancer Res*. 2020;9(9):5775–86.
32. Wang JX, Choi SYC, Niu X, Kang N, Xue H, Killam J, et al. Lactic acid and an acidic tumor microenvironment suppress anticancer immunity. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):1–14.
33. Pascale RM, Calvisi DF, Simile MM, Feo CF, Feo F. The warburg effect 97 years after its discovery. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):1–33.
34. Lau AN, Heiden MG Vander. Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Annu Rev Cancer Biol Annu Rev Cancer Biol* [Internet]. 2019;2020:17–40. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419->
35. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Zhang S, Gong Z, et al. The role of microenvironment

- in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):1–19.
36. McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours - Implications for treatment response. *Br J Radiol.* 2014;87(1035):1–12.
 37. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia.* 2015;83.
 38. Guo Y, Xiao Z, Yang L, Gao Y, Zhu Q, Hu L, et al. Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol Rep.* 2020;43(1):3–15.
 39. Baj J, Brzozowska K, Forma A, Maani A, Sitarz E, Portincasa P. Immunological aspects of the tumor microenvironment and epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7).
 40. Ricciardi M, Zanotto M, Malpeli G, Bassi G, Perbellini O, Chilosi M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immune-modulatory properties in cancer cells. *Br J Cancer [Internet].* 2015;112(6):1067–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.29>
 41. Zimmermann A. Mechanisms of Invasion and Metastasis: Cell Migration and Chemotaxis [Internet]. *Tumors and Tumor-Like Lesions of the Hepatobiliary Tract.* Springer International Publishing; 2017. p. 3323–50. Available from: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-319-26956-6_181
 42. Dominguez C, David JM, Palena C. Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor. *Semin Cancer Biol.* 2017;47:177–84.
 43. Spill F, Guerrero P, Matematica CDR, Bellaterra C De, Street G, Alarcon T, et al. Mesoscopic and continuum modelling of angiogenesis. *HHS Public Access.* 2017;70(3):485–532.
 44. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci [Internet].* 2020;77(9):1745–70. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>
 45. Jiramongkol Y, Lam EWF. FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39(3):681–709.
 46. Bergers G, Fendt SM. The metabolism of cancer cells during metastasis [Internet]. Vol. 21, *Nature Reviews Cancer.* Nature Research; 2021. p. 162–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41568-020-00320-2>
 47. Shen M, Kang Y. Stresses in the metastatic cascade: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Genes Dev.* 2020;34(23–24):1577–98.
 48. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms The Invasion-Metastasis Cascade. *Cell [Internet].* 2011;147(2):275–92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3261217/pdf/nihms329992.pdf>
 49. Fendt S, Frezza C, Erez A, Regulation M, Regulation M, Unit C, et al. Targeting metabolic plasticity and flexibility dynamics for cancer therapy. *HHS Public Access.* 2021;10(12):1797–807.
 50. Benzarti M, Delbrouck C, Neises L, Kiweler N, Meiser J. Metabolic Potential of Cancer Cells in Context of the Metastatic Cascade. *Cells.* 2020;9(9):1–25.
 51. Kreuzaler P, Panina Y, Segal J, Yuneva M. Adapt and conquer: Metabolic flexibility in cancer growth, invasion and evasion. *Mol Metab [Internet].* 2020;33(October 2019):83–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.08.021>
 52. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. EMERGING BIOLOGICAL PRINCIPLES OF METASTASIS. 2018;

53. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. 2008;
54. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista P V., Fernandes AR. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4).
55. Buoncervello M, Gabriele L, Toschi E. The janus face of tumor microenvironment targeted by immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17).