

RITA BROEIRO BAPTISTA

**FÁRMACOS ANTI-METASTIZAÇÃO: DA
INVESTIGAÇÃO À PRÁTICA CLÍNICA**

Orientador: Prof. Doutora Ana Sofia Fernandes

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa
2017**

RITA BROEIRO BAPTISTA

**FÁRMACOS ANTI-METASTIZAÇÃO: DA
INVESTIGAÇÃO À PRÁTICA CLÍNICA**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 6 de junho de 2017, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº: 141/2017, de 27 de abril de 2017, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Dulce Santos (especialista ULHT)
Arguente: Professor Doutor Nuno Saraiva (ULHT)
Orientadora: Professora Doutora Ana Sofia Fernandes (ULHT)
Vogal: Professora Ana Mirco (especialista ULHT)

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa
2017**

“Eu sei que não sou nada e que talvez nunca tenha tudo. Aparte isso, eu tenho em mim todos os sonhos do mundo”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Apesar da elaboração de uma dissertação implicar um trabalho solitário até que se alcance o objetivo final, contamos com o apoio e a colaboração de outras pessoas.

Começo por agradecer à orientadora deste projeto, a professora Dr^a Ana Sofia Fernandes, pela sua disponibilidade, orientação e pelas suas importantes opiniões e críticas que foram fundamentais para a concretização desta dissertação.

Um agradecimento especial às minhas amigas e colegas Catarina Cotrim e Maria Câncio que estiveram presentes até à etapa da concretização do nosso mestrado, agradeço-lhes pela força, companheirismo, amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

Por último, tendo consciência que esta etapa chegou ao fim por mérito próprio, foi essencial o apoio da minha família. Agradeço às pessoas mais importantes na minha vida, os meus pais e irmão, por todo o apoio prestado durante estes cinco anos de estudos mas principalmente nestes últimos meses, por todas as palavras de apoio incondicional, incentivo, amizade e paciência essenciais na superação e na conclusão desta dissertação, obrigada!

Abstract

This essay is focused on cancer metastasis. Tumor cell dissemination allows progressive secondary colonization of organs distant of the primary tumor. This process is named metastasis and due to its complexity, it is one of the main causes of cancer related death. The formation of metastases is controlled by various factors and is divided into different steps. Due to the increase of deaths caused by metastatic disease, research efforts have been focusing on the discovery of new therapeutic targets for this condition that would prevent the initial metastases and reduce/shrink established metastases. It has been reported that metastatic cells are not autonomous as they interact with the surrounding tumoral microenvironment, benefiting from its features.

This dissertation aims to perform a literature review of this complex disease known as metastasis. Topics such as recently FDA-approved anti-metastasis drugs and new therapeutic targets will be discussed herein. In addition, promising pre-clinical approaches will be discussed along with the trials that demonstrate their efficacy, serving as a promising basis for new and more advanced studies which will lead to their approval, consequently helping future generations.

Keywords: Cancer, metastasis, investigation, therapeutics.

Resumo

Este trabalho centra-se no problema da metastização associada ao cancro. A disseminação das células tumorais permite a colonização secundária progressiva de órgãos distantes do tumor primário. Este processo, designado de metastização, é uma das principais causas de morte por cancro. O processo metastático é controlado por diversos factores e está dividido em diferentes etapas. Atualmente, com o aumento do número de mortes por doença metastática, procura-se chegar a novos possíveis alvos para terapêuticos, cujo o objetivo se resume à prevenção da metastização inicial e à redução das metástases já estabelecidas. Verificou-se que as células metastáticas não apresentam autonomia, uma vez que interagem com o microambiente tumoral envolvente, tirando partido das suas características.

A presente dissertação teve como principais objetivos a revisão da literatura deste fenómeno tão complexo que é a metastização. Aqui são abordadas temáticas como medicamentos anti-metastização, aprovados recentemente pela FDA, a descoberta de novos alvos nesta terapêutica e as abordagens pré-clínicas promissoras que projetam o progresso para outros estudos mais avançados que provem a sua eficácia para serem aprovados e poderem ajudar gerações futuras.

Palavras-Chave: Cancro, metastização, investigação, terapêutica.

Índice de Abreviaturas

5-FU – 5-Fluouracilo

AIF – Fator Indutor de Apoptose

ALK – Receptor tirosina-quinase do linfoma anaplásico

APC/C – Complexo promotor da anafase/ciclossoma

APAF1 – Protease Apoptótica Ativadora de Fator 1

ATP – Trifosfato de adenosina

Bak – Proteína Killer-Antagonista homóloga a Bcl-2

Bax – Proteína 4 tipo Bcl-2

Bcl-2 – Proteína 2 de linfoma de células B

BFB – Quebra-fusão-ponte

BV – Bevacizumab

C1P – Ceramida-1-fosfato

CAF – Fibroblastos associados ao cancro

CCL2 – Ligando 2 de quimiocina com motivo C-C

CCR – Carcinoma de células renais

CCR2 – Receptor de CCL2

CD11b/Gr1^{mid} – Marcador clássico de linhas mieloides 11b e marcador granulocítico^{1 mid}

CD3 – Glicoproteína grupo de diferenciação 3

CD4 – Glicoproteína grupo de diferenciação 4

CD8 – Glicoproteína grupo de diferenciação 8

ciAPs – Inibidores celulares de proteínas apoptóticas

CIN – Instabilidade cromossómica

COX2 – Ciclooxigenase 2

CSCs – Células estaminais do cancro

CoaC – Cascata de coagulação

ComC – Cascata do complemento

CSFs – Fatores estimuladores de colónias

CTLA4 – Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos

c-Src – Proto-oncogene da tirosina cinase Src

CXCL16 – Quimiocina (C-X-C motif) ligando 16

CXCR6 – Receptor de CXCL16

DSB – Quebras de cadeia dupla

DTCs – Células tumorais disseminantes

ECM – Matriz extracelular

ECOG – *Eastern Cooperative Oncology Group*

EMA – *European Medicines Agency*

EMT – Transição epitelial-mesenquimal

EMT-FT – Factores de transcrição que induzem EMT

ESR1 – Receptor de Estrogénio 1

FADD – Proteína de domínio de morte associada a Fas

FDA – *Food and Drug Administration*

FibC – Cascata fibrinolítica

FKBP-12 – Proteína de ligação a FK506

GAS6 – Específico de interrupção do crescimento 6 (*Growth arrest specific 6*)

HGF/SF – Fator de crescimento dos hepatócitos/fator de dispersão

HIF1 α – Fator indutível por hipóxia 1 α

HSCs – Células estaminais hematopoéticas

IFL – Leucovorina

iNOS – Síntase de óxido nítrico indutível

IV – Via Intravenosa

LOXL2 – Proteína tipo lisil oxidase 2

MDM2 – Homólogo humano do murino duplo minuto 2

MDSCs – Células supressoras derivadas da linhagem mieloide

MIU – Milhões de unidades internacionais

MSKCC – *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*

MHC – Complexo major de histocompatibilidade

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

MSI ou MIN – Instabilidade de microssatélites

MSC – Células supressoras mieloides

NDRG1 – *NMYC downstream-regulated gene 1*

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NSCLC – Cancro das células não pequenas do pulmão

OMS – Organização Mundial de Saúde

OS – Sobrevida global do paciente

ORR – Taxa de resposta objetiva

p14^{ARF} – Gene supressor de tumor da proteína p14

p53 – Proteína 53

PDL1 – Ligando de PD1

PFS – Sobrevida livre de progressão

PTEN – Proteína fosfatase e homóloga da tensina

- pRB** – Proteína retinoblastoma
- PSA** – Antígeno prostático específico
- PTKs** – Proteínas tirosina cinase Intracelular
- PD1 ou PDCD1** – Proteína 1 da morte celular programada
- RB1** – Gene supressor de tumor da proteína retinoblastoma
- RET** – Proto-oncogene que codifica um receptor da tirosina-cinase
- ROS** – Espécies reativas de oxigénio
- RTK** – Receptores tirosina cinase
- ROS-1** – ROS proto-oncogene 1 que codifica um receptor tirosina-cinase
- RNA** – Ácido ribonucleico
- RAS** – Oncogene *RAt Sarcoma vírus*
- RANKL** – Receptor activator do NF- κ B
- S1P** – Esfingosina-1-fosfato
- SDF-1** – Fator derivado de células do estroma
- SFKs** – Proteínas tirosina cinase da família Src
- siRNAs** – RNA silenciadores
- SRE** – Eventos relacionados com o esqueleto
- STAT3** – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
- TAM** – Macrófagos associados a tumores
- TGF- β 1** – Fator de transformação de crescimento β 1
- TIL** – Linfócitos infiltrados no tumor
- TME** – Microambiente tumoral
- TNF** – Fator de Necrose Tumoral
- TNFSF11** – Membro 11 da superfamília de ligandos do TNF
- TP53** – Gene supressor de tumor da proteína p53
- TSP-1** – trombo-espondina-1
- UTP** – Trifosfato de uridina
- UV** – Ultravioleta
- VEGF-A** – Fator de crescimento do endotélio vascular A
- VEGFR-2 (Flk-1)** – Recetor 2 do VEGF-A (cinase hepática fetal)
- VEGFR-1 (Flt-1)** – Recetor 1 do VEGF-A (tirosina cinase 1 tipo Fms)

Índice de Figuras

Figura 1 – Previsão da Evolução da Incidência e Mortalidade do Cancro no Mundo (2015 a 2035)

Figura 2 – Previsão da Evolução da Incidência de Cancro em Portugal (2015 a 2035)

Figura 3 – Estimativa do número de incidência e mortalidade de casos em ambos os sexos em Portugal 2012

Figura 4 – Sobrevivência em 5 anos para pacientes com cancro inicialmente diagnosticados com doença metastática

Figura 5 – Capacidades que o cancro adquire para alcançar o seu desenvolvimento, sobrevivência e progressão

Figura 6 – Modelo da ativação do controlo de danos do DNA no cancro

Figura 7 – Associações entre a inflamação e o risco de desenvolvimento de cancro

Figura 8 – Caminhos que conectam a inflamação ao cancro

Figura 9 – Passos principais na formação da metastização

Figura 10 – Indução do microambiente receptivo a metástases, em diferentes órgãos, após tratamento por quimioterapia ou radioterapia

Figura 11 – Modo de atuação de Denosumab

Figura 12 – Estimativas Kaplan-Meier do tempo para o primeiro evento relacionado com o esqueleto (SRE) (A) e para a primeira e subsequente SREs (B)

Figura 13 – Modo de atuação de Bevacizumab.

Figura 14 – Modo de atuação de Cilengitide.

Figura 15 – Modo de atuação do Desatinib e Saracatinib

Índice de Tabela

Tabela 1 – Estudos de sequenciação genómica

Tabela 2 – Resultados resumo da eficácia do denosumab comparado com o ácido zoledrónico.

Tabela 3 – Esquema do protocolo das terapias do ensaio.

Índice

Capítulo 1 - Enquadramento	1
1. Epidemiologia do Cancro	1
2. Cancro	5
1.2. Características das Células Tumorais	6
1.2.1. Autonomia dos sinais de crescimento	6
1.2.2. Mecanismos de evasão à ação dos genes supressores	7
1.2.3. Resistência à morte celular	9
1.2.4. Indução da angiogénese	11
1.2.5. Potencial de replicação ilimitado	12
1.2.6. Instabilidade genómica e mutação	13
1.2.7. Promoção da inflamação	15
1.2.8. Impedimento da destruição imune	17
1.2.9. Reprogramação do metabolismo energético	19
1.2.10. Metastização	21
1.2.10.1. Microambiente Tumoral	25
Capítulo 2 – Tratamento	28
3. Fármacos Anti-Metastização	31
3.1. Prática Clínica	31
3.1.1. Anticorpo Monoclonal Humanizado – Denosumab	31
<u>Cancro da Mama Metastizado</u>	<u>32</u>
Estudo 1 – <i>Denosumab Compared With Zoledronic Acid For Treatment Of Bone Metastasis In Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study</i>	32
<u>Cancro da Próstata Metastizado</u>	<u>34</u>
Estudo 2 – “Denosumab Versus Zoledronic Acid For Treatment Of Bone Metastasis In Men With Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized, Double-Blind Study”	34
Estudo 3 – “Denosumab And Bone Metastasis-Free Survival In Men With Castration-Resistant Prostate Cancer: Results of a phase 3, Randomized, Placebo-Controlled Trial”	35
<u>Cancro Avançado (Excepto Cancro da Mama e Próstata)</u>	<u>35</u>
Estudo 4 – “Randomized, Double-Blind Study of Denosumab Versus Zoledronic Acid The Treatment of Bone Metastasis in Patients With Advanced Cancer (Excluding Breast Cancer and Prostate Cancer) or Multiple Myeloma”	36
3.1.2. Anticorpo Monoclonal Humanizado – Bevacizumab	37
<u>Cancro do Colorretal Metastizado</u>	<u>38</u>
<u>Cancro da Mama Metastizado</u>	<u>42</u>
<u>Carcinoma Renal Metastizado</u>	<u>43</u>
<u>Cancro Colo do Útero Persistente, Recorrente ou Metastático</u>	<u>46</u>
3.1.3. Crizotinib	47
3.1.4. Ipilimumab	48

3.1.5. Pembrolizumab	49
3.1.6. Cilengitide.....	50
<u>Melanoma Metastizado</u>	51
Estudo 1 - A randomized phase II study of cilengitide (EMD 121974) in patients with metastatic melanoma.....	51
<u>Glioblastoma</u>	52
Estudo 2 - Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter: a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial.....	52
3.1.7. Desatinib e Saracatenib	52
3.2. Investigação	54
3.2.1. Seeding	54
3.2.2. Fase de dormência.....	55
3.2.2.1. Prisioneiro de crescimento específico 6 - GAS6.....	55
3.2.2.2. Detecção de células dormentes.....	56
3.2.3. Colonização Metastática	56
3.2.3.1. Mutações TP53 e Plasticidade Transcricional	56
3.2.3.2. Supressão da Metastização por CXCL16	57
3.2.3.3. Inibição de CCL2 Suprime a Metastização.....	58
3.2.3.4. Repressão da Colonização Metastática por LOXL2	58
3.2.3.5. Bloqueio de CTLA4	60
3.2.3.6. Bloqueio de PD1	60
Capítulo 3 – Considerações Finais	61
Capítulo 4 – Referências Bibliográficas	64

Capítulo 1 - Enquadramento

1. Epidemiologia do Cancro

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro é das principais causas de morbilidade e de mortalidade em todo o mundo, correspondendo à principal causa de morte nos países desenvolvidos e à segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. Esta doença tornou-se num dos maiores problemas da Saúde Pública, havendo um crescimento progressivo do número de novos casos.¹⁻⁴ De acordo com os dados do GLOBOCAN 2012, estima-se que em 2035 o impacto global do cancro é de cerca de 10 milhões de novos casos diagnosticados e 6,4 milhões de mortes (Figura 1). A OMS estima ainda que cerca de 1/3 dos casos do cancro poderiam ser prevenidos.⁵

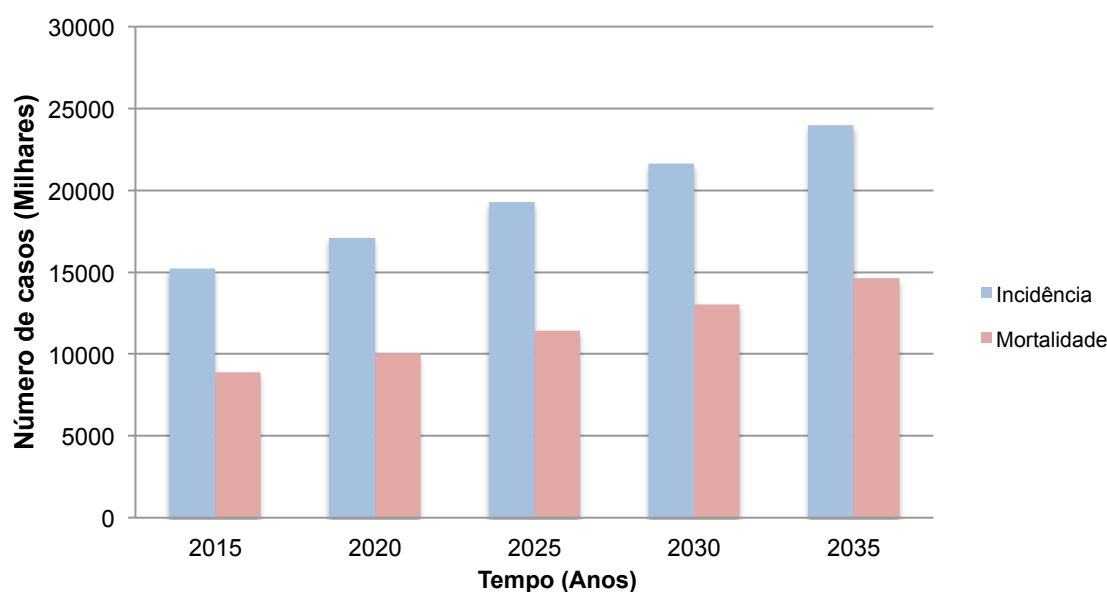


Figura 1 – Previsão da Evolução da Incidência e Mortalidade do Cancro no Mundo (2015 a 2035). Figura de elaboração própria a partir dos dados disponíveis em International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012⁵

Relativamente a Portugal, prevê-se que até 2035 se vai manter a tendência da evolução da incidência de casos de cancro de aproximadamente 10.000 novos casos (Figura 2).⁴

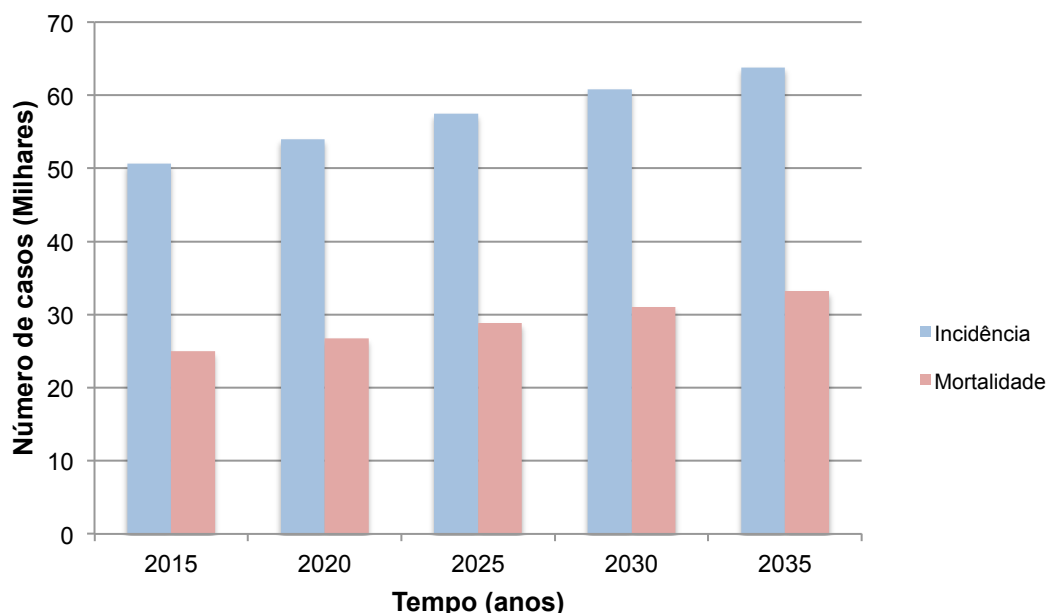


Figura 2 – Previsão da Evolução da Incidência de Cancro em Portugal (2015 a 2035). Figura de elaboração própria a partir dos dados disponíveis em International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012⁵

O tratamento e a cura para o cancro têm sido muito estudados. Contudo, dada a importância de encontrar a cura desta doença surgem algumas dificuldades devido à existência de mais de uma centena de diferentes tipos de cancros e ainda ao escasso conhecimento da patogénese dos tumores malignos. Em Portugal, aproximadamente metade do número de novos casos de cancro diagnosticado, em 2012 são atribuíveis ao cancro do cólon, da próstata e da mama. Enquanto que cerca de metade do número de mortes estão associados ao cancro do cólon e da próstata.⁴⁻⁶

A mortalidade em Portugal, devido aos tumores malignos mais comuns, é proporcional à incidência dos mesmos no nosso país. Isto é, o cancro do cólon é aquele que apresenta maior incidência e a maior mortalidade. Conclui-se assim que dos seis tumores com maior incidência e com maior taxa de mortalidade temos o do cólon, o da próstata, o da mama, o do pulmão, o do estômago e o da bexiga (Figura 3).^{6,7}

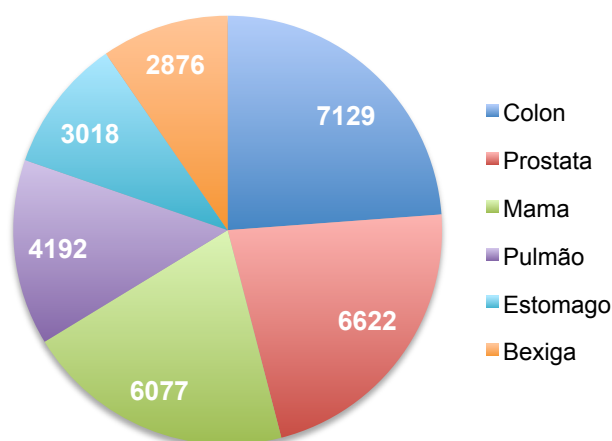
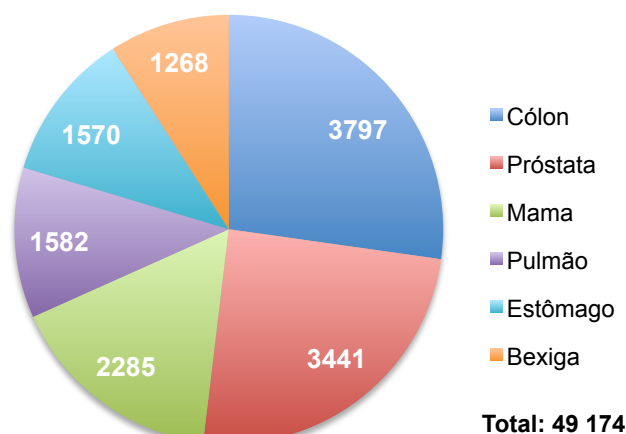
Incidência**Mortalidade**

Figura 3 - Estimativa do número de incidência e mortalidade de casos em ambos os sexos em Portugal 2012. Figura de elaboração própria a partir dos dados disponíveis em International Agency for Research on Cancer – World Health Organization ⁷

Sabendo que o diagnóstico da doença metastática na maioria dos pacientes indica uma doença terminal, pretende-se que o foco da presente dissertação se centre neste problema. Verifica-se que passados dez anos, os pacientes diagnosticados com doença localizada, geralmente apresentam uma sobrevivência em cinco anos caracterizada como excelente (Figura 4a). Os cancro da mama, da próstata e uterino apresentam uma sobrevivência a cinco anos que não é muito diferente da constatada em 2005. Os cancros que apresentam uma sobrevivência a 5 anos superior, e mais discrepante da apresentada em 2005, são os do pâncreas, o do esófago e o dos pulmões. Apesar de apresentarem uma menor sobrevivência em cinco anos, são aqueles que aumentaram em dez anos. Pacientes com doença regional, ou seja metastização nos gânglios regionais, no momento do diagnóstico têm uma sobrevivência global mais baixa. A excepção verifica-se nos doentes com cancro da bexiga ou da próstata, uma vez que não apresentam ganhos na sobrevivência em dez anos (Figura 4b). Observando o panorama de pacientes com doença metastática distante (Figura 4c), apenas quatro dos doze locais apresentados no gráfico (colorectal, esófago, pulmonar e oral) apresentam ganhos de sobrevida no momento do diagnóstico. Desses, apenas o cancro na cavidade oral, apresentou um ganho de sobrevivência superior a 3%. Desta forma, podemos verificar o quão alarmante se encontra a situação da metastização do cancro, uma

vez que a sobrevivência a cinco anos diminuiu entre a metastização regional e a metastização distante, incluiu-se aqui o cancro dos ovários, próstata e útero.⁸

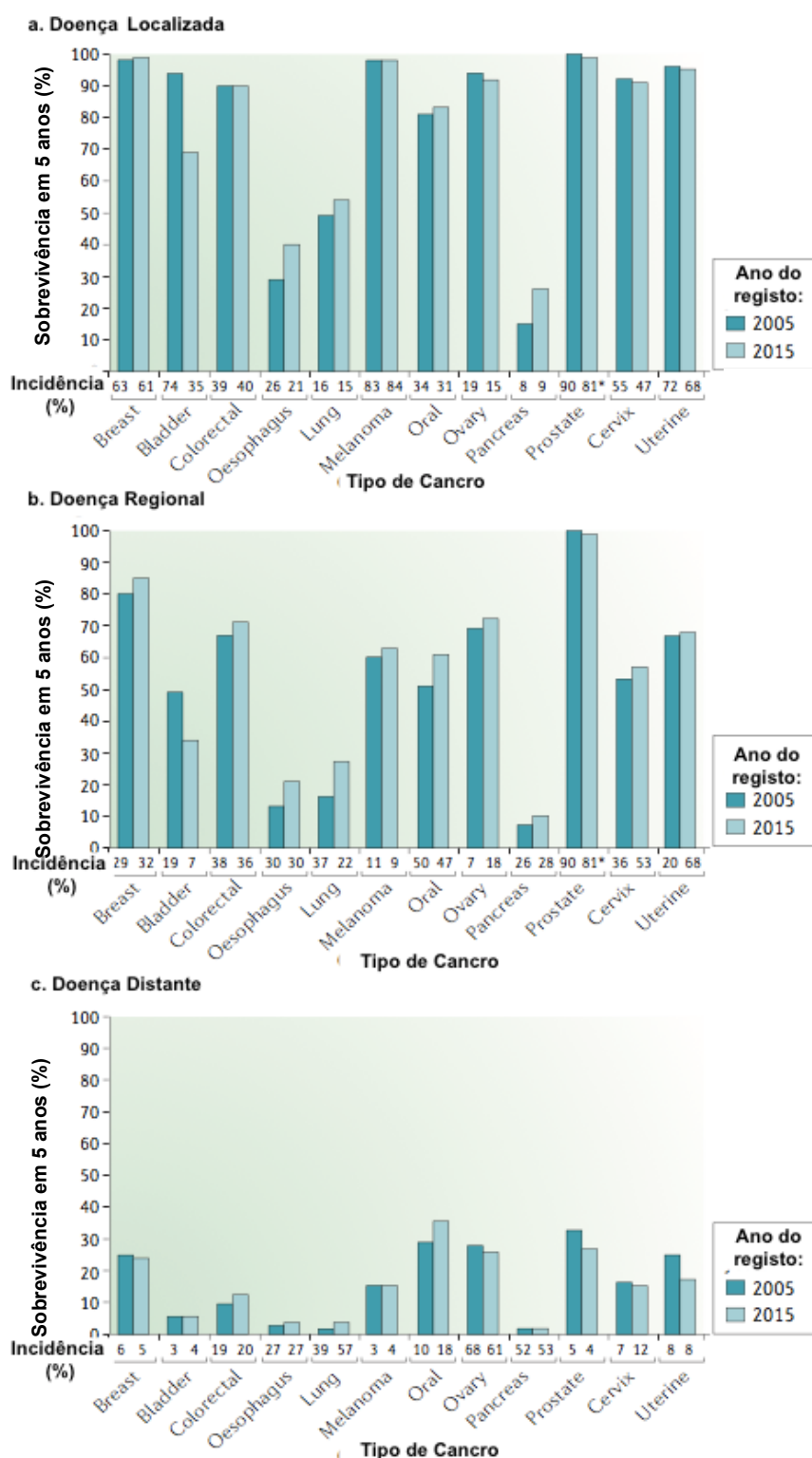


Figura 4 – Sobrevivência em 5 anos para pacientes com cancro inicialmente diagnosticados com doença metastática **Fonte:** Steeg, S. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–18 (2016)

2. Cancro

Segundo Weinberg (1988), a origem desta doença parece ser desconhecida. Contudo, pensa-se estar associada à inibição dos genes supressores de tumores e à ativação dos oncogenes, devido a alterações sofridas em ambos genes.⁹ Os genes supressores de tumores codificam proteínas que são responsáveis pela inibição do crescimento celular. PTEN (Proteína fosfatase e homologia da tensina) é considerado o gene mais mutado ao nível do cancro humano levando à sua perda de função.^{10,11}

Sabe-se que nas células dos organismos multicelulares existem mecanismos que são responsáveis pelo controlo do crescimento e proliferação celular. As células são submetidas ao ciclo celular, ocorrendo repetidamente de forma a que a célula dê origem a várias réplicas. Quando surge um erro no seu material genético, existem mecanismos de reparação capazes de corrigi-lo e a célula pode manter-se saudável.^{6,9} Alguns genes supressores tumorais têm a capacidade de regular enzimas que corrigem esses erros genéticos. Contudo, quando ocorre uma mutação nestes genes, as enzimas podem perder essa capacidade. Não havendo correção destes erros, podem acumular-se múltiplas mutações genéticas que irão desencadear um crescimento descontrolado da célula precursora de cancro. Esta célula pode apresentar os mecanismos de crescimento alterados, desencadeando um crescimento descontrolado da célula cancerosa e mais tarde, pode levar à metastização em vários órgãos.^{9,12,13}

De acordo com Renan¹⁴ as análises estatísticas indicam que múltiplas mutações em genes alvo específicos são fundamentais para que ocorra a formação e o desenvolvimento de tumores clinicamente diagnosticáveis. Assim, lesões no material genético representam marcadores importantes para a detecção e adeterminação do grau do cancro.^{13,14}

Em 2000, Hanahan e Weinberg¹⁵, apresentaram um modelo que demonstra que os diversos fenótipos de células de cancro são uma manifestação das seis características que ditam a sobrevivência, a proliferação e a metastização das células tumorais. Neste modelo, encontravam-se inicialmente capacidades como, a autonomia dos sinais de crescimento, os mecanismos de evasão à ação dos genes supressores, a resistência à morte celular, a indução da angiogénese, o potencial de replicação ilimitado e a invasão dos tecidos e metastização. Os mesmos autores, em 2010 conseguiram melhorar o modelo, acrescentando quatro outras capacidades demonstradas pelo cancro. O impedimento da destruição pelo sistema imunitário, a promoção da inflamação, a instabilidade genómica e mutação e a reprogramação do

metabolismo energético foram as novas capacidades acrescentadas ao modelo proposto por Hanahan e Weinberg. Estas características adquiridas pelo tumor desencadeiam uma independência do crescimento da célula relativamente aos sinais do ambiente. Isto irá provocar desregulação da proliferação celular, desencadeando tumores macroscópicos.^{15–17}

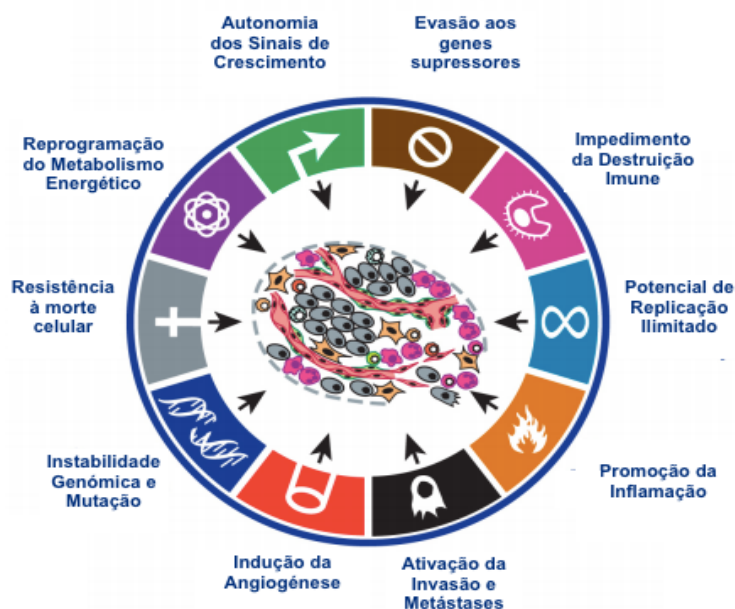


Figura 5 – Características que o cancro adquire para alcançar o seu desenvolvimento, sobrevivência e progressão. **Fonte:** Hanahan, D. & Weinberg, R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).

1.2. Características das Células Tumorais

1.2.1. Autonomia dos sinais de crescimento

Na superfície celular das células normais, encontram-se receptores do tipo tirosina cinase (RTK) que contêm, domínios de tirosina cinase intracelulares (PTKs). Quando ocorre a ligação dos fatores de crescimento a estes receptores, as PTKs emitem sinais através das vias de sinalização intracelular, que regulam a progressão do ciclo celular. No caso das células tumorais estes sinais encontram-se desregulados, podendo influenciar a sobrevivência e o metabolismo destas células.^{15,16,18} Podem ocorrer mutações nos RTK, desregulando a sua sinalização, provocando a sua sobre-expressão e aumentando as proteínas receptoras que levam as células a responder em maior quantidade ao ligando do fator de crescimento.^{15,18,19}

As células cancerosas podem controlar a proliferação celular, produzindo ligandos de fatores de crescimento, a que respondem através dos respetivos receptores, resultando na estimulação da proliferação autócrina. Podem ainda enviar sinais estimulantes para as células normais próximas do tumor, fornecendo vários fatores de crescimento ao mesmo.

1.2.2. Mecanismos de evasão à ação dos genes supressores

Para além da capacidade que os tumores têm de controlar positivamente, os fatores de crescimento, podem ainda atuar nos genes supressores de tumores que regulam negativamente a proliferação celular. Existem dezenas de genes supressores de tumores, cuja atividade se baseia na redução do crescimento celular e proliferação. A maioria dos tumores apresenta determinadas mutações que podem interromper o controlo do crescimento normal das células, da divisão celular ou do desencadeamento da apoptose em caso de danos genéticos. Dois importantes genes supressores de tumores são o *RB* e o *TP53*. Enquanto que o *TP53* é um gene supressor de tumor que codifica a proteína tumoral p53, o *RB1*, codifica a proteína retinoblastoma (pRB).^{15,20,21}

Inicialmente, pensou-se que a função supressora de tumores da RB seria a capacidade de reter as células na fase G1, bloqueando a sua transição desta fase para a fase S do ciclo celular. Após realização do *knockout* do gene da pRB em fibroblastos de ratos embrionários, verificou-se a rápida entrada em fase S. Assim, confirmou-se que quando esta proteína é expressa ocorre um bloqueio do ciclo celular, fazendo com que permaneça na fase G1, através da inibição da expressão dos genes dos fatores de transcrição E2F. Estes genes codificam enzimas importantes na síntese de desoxinucleótidos, envolvidas no início da replicação do DNA, alguns oncogenes e ainda ciclinas e Cdk. ^{16,22,23}

Atualmente, conhecem-se outras capacidades desta proteína, nomeadamente, o seu controlo da diferenciação celular, a sua regulação da apoptose, a sua manutenção de paragem do ciclo celular e a sua preservação da estabilidade cromossomal.^{15,22,24,25}

Binné (2007) e Peng (2004) demonstraram que a capacidade da RB em reter a célula na fase G1, não ocorre apenas por interação com E2F mas sim também com promotores de anafase APC/C (Complexo promotor da anafase/ciclossoma). Assim, a RB pode ligar-se antagonizando ou potenciando a função de inúmeros fatores de transcrição.^{23,24,26}

Relativamente ao gene supressor de tumores *TP53*, este codifica a proteína p53 que desempenha um papel chave na regulação do ciclo celular e na apoptose, em resposta a vários tipos de stress ou quando as células estão lesadas. Estudos recentes demonstram a existência de pelo menos três fatores que desencadeiam a ativação de p53. A primeira via, é desencadeada através danos genéticos, a segunda corresponde aos sinais de crescimento resultantes da expressão de oncogenes e por último, surgem os fármacos de quimioterapia, a luz ultravioleta (UV) e os inibidores das proteína cinases.²⁷⁻³¹

O proto-oncogene *MDM2* (Homólogo humano do murino duplo minuto 2) é um potente regulador negativo de p53, que quando se liga, impede a ativação da transcrição promovendo a sua degradação por ubiquitinação e por proteólise. O *MDM2* é fundamental para manter a p53 ativa. Também o gene supressor p14^{ARF} participa no loop, uma vez que interage diretamente com *MDM2* e antagoniza a sua inibição de p53. A p53 por sua vez reprime a expressão de p14^{ARF}. O feedback p14^{ARF}/*MDM2*/p53 permite controlar o balanço da proteína p53, garantindo a manutenção da integridade do genoma e a prevenção de cancro. Mutações em *MDM2* e p14^{ARF} afetam a atividade supressora de tumor do p53 e consequentemente, promovem o desenvolvimento de cancro.^{28,29,32-35}

Logo que ocorra um erro genético, os níveis de p53 aumentam rapidamente, desencadeando uma inibição do crescimento celular e a paragem do mesmo, na fase G1 para que este erro seja corrigido. A função da proteína é controlada através da sua interação com o proto-oncogene. O *MDM2* vai desencadear a redução na estabilidade de p53. Desta forma, consegue inibir a função de p53 impedir a continuação do ciclo celular e impedir a apoptose, permitindo a passagem para a fase S. Desta forma, consegue-se então evitar a ação dos genes supressores de tumores. A acumulação de alterações genéticas e a incapacidade de eliminar estas alterações, aumenta a predisposição para o desenvolvimento de tumores na ausência de p53.^{34,36,37}

1.2.3. Resistência à morte celular

Lockshin (1964) propôs a designação de morte celular programada, quando esta ocorre de forma não acidental. Mais tarde, Kerr et al (1972) veio atribuir a este acontecimento, o nome de apoptose. Estes autores, destacaram a importância da eliminação de células de forma controlada.³⁸⁻⁴⁰ Inicialmente pensava-se que a proliferação celular e a morte celular seriam mecanismos completamente opostos. Contudo, descobriu-se que estes dois processos podem estar interligados.^{15,41,42}

Ao longo das últimas décadas, foram realizados estudos que indicaram que a apoptose constitui uma barreira natural para o desenvolvimento de cancro. Sabendo que a apoptose é desencadeada em resposta a diversas tensões fisiológicas que as células tumorais estão sujeitas.^{41,43,44}

Todos os tumores compartilham a capacidade de proliferar para além das limitações do crescimento nas células normais. Tal como já foi mencionado anteriormente, o cancro é desencadeado após alterações nos mecanismos de controlo da proliferação e sobrevivência celular. A evolução neoplásica ocorre quando estamos na presença de proliferação desregulada e da apoptose.⁴²

Das várias tensões que induzem a apoptose, podem-se destacar, o desequilíbrio resultante dos altos níveis de oncogenes, os erros no DNA responsáveis pela hiperproliferação. Outros estudos indicam ainda que, quando os tumores conseguem progredir, o processo de apoptose é atenuado.^{41,43}

Como mencionado anteriormente, a proteína p53 tem um papel importante na apoptose e quando esta proteína se encontra expressa, desencadeia uma paragem do crescimento e/ou apoptose.^{15,30,35,37,45}

O mecanismo de morte celular programada está dividido em dois circuitos principais, a via extrínseca (citoplasmática) ou a via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é ativada logo que ocorra a ligação de ligandos específicos com os receptores de membrana, da família dos do fator de necrose tumoral (TNF), que vão desencadear uma série de eventos nomeadamente a ativação da cascata das caspases. De seguida, os receptores de morte celular vão reconhecer o ligando específico. Por sua vez, os seus domínios de morte interagem com FADD (Proteína de domínio de morte associada a Fas), também chamado de MORT-1, que têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que por sua vez ativa a caspase-3, desencadeando a morte celular programada.^{43,46-48}

Ultimamente, tem sido demonstrado o envolvimento de TNF em várias etapas de desenvolvimento do cancro, entre elas, a transformação celular, a sobrevivência, a proliferação, a invasão e a angiogénese. O TNF permite

desencadear a ativação de NF- κ B, enquanto os genes alvo de NF- κ B, regulam a proliferação celular. O NF- κ B vai ativar a transcrição de genes responsáveis pelo bloqueio da indução da morte celular programada por TNF- α . Os fatores anti-apoptose induzidos por NF- κ B, incluem os inibidores da apoptose (cIAPs), a caspase-8/FADD, o c-FLIP e os membros da família Bcl-2 (Proteína 2 de linfoma de células B).⁴⁹⁻⁵¹

A via intrínseca é atualmente a mais apontada como uma barreira para a patogénese do cancro. Esta via é ativada quando a célula está sujeita a stresses tais como hipóxia, ativação de oncogenes e privação de fatores de crescimento. Após ser ativada, vão ocorrer alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, conduzindo à libertação do citocromo c para o citosol, que por sua vez se vai ligar a dATP, APAF1 (Protease Apoptótica Ativadora de Fator 1) e a pró-caspase-9, formando um complexo. A caspase-9 após ser ativada irá clivar as caspases subsequentes, amplificando os sinais e desencadeando a apoptose. Joza (2001) demonstrou a importância do fator Indutor de Apoptose (AIF) nesta via, após estímulo apoptótico. Refere o autor que este fator migra para o núcleo induzindo a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA, independentemente da ativação das caspases.^{46,52-54}

O processo de passagem do citocromo c pela membrana mitocondrial ainda não é bem conhecido, mas sabe-se que a família Bcl-2 está envolvida neste processo. Enquanto Bcl-2 é um inibidor da apoptose, as proteínas relacionadas Bax (Proteína 4 tipo Bcl-2) e Bak (Proteína Killer-Antagonista homóloga a Bcl-2) são proteínas pró-apoptóticas e irão perturbar a membrana mitocondrial externa, libertando proteínas pró-apoptóticas que permitem a libertação do citocromo c. Esta libertação, ativa a cascata de caspases, que por sua vez irá induzir a apoptose. Após um estímulo de morte, a Bcl-2 vai inibir a permeabilização da membrana mitocondrial externa, pelo que o citocromo c não será libertado e desta forma não ocorre a ativação da cascata de caspases, não havendo morte celular programada.^{15,43,46,55,56}

As células tumorais encontram várias formas de contornar a apoptose. A mais comum é a perda da função do gene supressor TP53, evitando assim a correção dos erros genéticos que tenham ocorrido ou ainda, no caso de não correção, impedindo a entrada em apoptose. As células tumorais podem também aumentar a expressão de reguladores negativos da apoptose, nomeadamente Bcl-2, por desregulação de fatores pró-apoptóticos como Bax e Bak, ou ainda, por alterações no TNF, componente importante na via extrínseca da apoptose.^{15,46}

1.2.4. Indução da angiogénese

Para que um tumor se continue a desenvolver e propagar, é essencial o crescimento de vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente, para satisfazer as necessidades do mesmo. Este processo designa-se de angiogénese. A angiogénese é estimulada quando os tecidos necessitam de nutrientes e oxigénio e divide-se em quatro etapas. Primeiramente, a membrana basal dos tecidos é ferida localmente havendo destruição e hipóxia e de seguida as células endoteliais ativadas pelos fatores angiogénicos migram, proliferam e estabilizam. A angiogénese é então regulada por fatores que induzem ou que se opõem a este processo e a alguns destes reguladores sendo proteínas de sinalização, ligam-se a receptores de superfície celular das células vasculares endoteliais.^{15,57,58}

O VEGF-A (Fator de crescimento do endotélio vascular A) é o principal indutor da angiogénese estimulando diretamente as células endoteliais através, do seu receptor (Flk-1) (Recetor 2 do VEGF-A (cinase hepática fetal)) ou o VEGFR-1 (Flt-1) (Recetor 1 do VEGF-A (tirosina cinase 1 tipo Fms). O receptor VEGFR-1, modula a ligação de VEGF ao receptor VEGFR-2, que por sua vez, induz uma resposta endotelial eficiente, estimulando cada passo na angiogénese. A expressão do gene VEGF pode estar aumentada tanto por hipóxia como pela sinalização de oncogenes.^{57,59,60}

Contrabalançando, o TSP-1 (trombo-espondina-1) como responsável pela inibição da angiogénese, verifica-se que também este se vai ligar a receptores transmembranares das células endoteliais, chamando supressores, contrariando o processo angiogénico.⁶¹

A vasculatura tumoral, contrariamente à vasculatura normal, é composta por uma mistura caótica de vasos, hierarquicamente desorganizados. A vascularização no tumor varia, aumentando em locais cujo crescimento é ativo, muitas vezes na periferia e estando ausente em regiões de necrose. Estas diferenças de densidade vascular, em diferentes locais, podem complicar as estimativas de vascularização tumoral. Tumores com elevada densidade tendem a ser mais agressivos e propensos a metástases. Contrariamente aos vasos sanguíneos normais, a área de superfície encontra-se modificada relativamente ao volume, prejudicando a absorção de nutrientes.^{57,62,63}

Ultimamente, a angiogénese tem sido bastante estudada, tendo-se destacado alguns avanços na compreensão da mesma. Inicialmente pensava-se que este processo era apenas importante após a rápida formação de tumores. Contudo, dados mais recentes afirmam que a angiogénese não é apenas importante

para esse processo, mas também contribui para a fase pré-maligna de progressão neoplásica.^{15,62}

1.2.5. Potencial de replicação ilimitado

Como já foi referido anteriormente, num tumor, as células cancerosas proliferam rapidamente e exigem um potencial replicativo ilimitado para que o tumor se propague e gere tumores macroscópicos.

Evidências indicam que os telómeros, estruturas repetitivas compostas por proteínas e DNA não codificante conservado ao longo do tempo, formam as extremidades dos cromossomas e envolvem-se na capacidade de proliferação ou na replicação ilimitada. Pensa-se que a replicação incompleta de moléculas lineares de DNA pela DNA polimerase, a degradação por uma exonuclease e o stress oxidativo, são processos que contribuem para o encurtamento dos telómeros. A maioria das células tumorais expressam a telomerase, uma enzima responsável pela extensão do comprimento dos telómeros, combatendo a erosão progressiva dos telómeros de forma a contornar as limitações da replicação. Desta forma, a presença de telomerase está relacionada com a resistência à apoptose e à senescência. Contudo, quando ocorre a supressão da atividade desta enzima, ocorre um encurtamento dos telómeros, desencadeando a ativação da apoptose ou da senescência.^{15,64–66}

Sabe-se que a senescência e a morte celular programada são duas barreiras protetoras da expansão neoplásica. O encurtamento telomérico tem sido considerado como um aspeto determinante no potencial replicativo limitado de células normais, sendo superado nas células tumorais com a ajuda da telomerase. Desta forma, o cancro consegue continuar a desenvolver-se e propagar-se.^{15,67}

Como vimos anteriormente, a proteína p53 é bastante importante no processo de correção de erros genéticos. A ausência desta proteína pode permitir neoplasias sobreviventes ao encurtamento dos telómeros e aos ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB). Destes ciclos resultam alterações que incluem deleções e amplificações de segmentos, capazes de aumentar a mutabilidade do genoma. O aumento do número de mutações genómicas desencadeia a rápida aquisição de oncogenes mutantes e a inativação de genes supressores de tumores.^{66,67}

1.2.6. Instabilidade genómica e mutação

A instabilidade genómica é uma característica da maioria dos tumores humanos. Durante a proliferação celular, existem sistemas de manutenção do genoma, que detetam e resolvem erros no DNA, fazendo com que a taxa de mutação seja muito baixa. Durante o processo de carcinogénese, os sistemas de controlo encontram-se comprometidos, permitindo a ocorrência de diversas mutações genéticas de diversos tipos. Certas alterações para além de serem hereditárias podem ser adquiridas através de mecanismos epigenéticos (metilação do DNA, modificações histónicas etc) como a inativação de genes supressores de tumores. Isto provoca um aumento da taxa de mutação, que desencadeado por diferentes tipos de mecanismos, origina instabilidade genómica.^{68,69}

Estudos feitos em vários tipos de cancros, entre eles, o do cólon e o da mama (os mais frequentes), avaliaram as mutações presentes. Para cada tumor foi feito um estudo de sequenciação dos genes e dessa forma, pôde-se comparar as mutações presentes em cada tumor, podendo verificar-se que em qualquer um dos tumores estão presentes bastantes mutações, o que confirma a tal instabilidade genómica. (Tabela 1)

Tabela 1 – Estudos de Sequenciação genómica. Tabela de elaboração própria a partir dos dados de Salk, J. J., Fox, E. J. & Loeb, L. A. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 51–75 (2010) ⁷⁰

Tipo de Estudo	Número de genes examinados	Número total de mutações	Número de genes mutados	Número médio de mutações por tumor	Número estimado de mutações condutoras
Exómico					
Mama (n=11)	18.191	1243	1137	84	140
Colorectal (n=11)	18.191	942	848	76	140
Diversos (n=210)	518	798	581	-	119
Pâncreas (n=24)	20.661	1163	1007	48	160
Glioblastoma (n=21)	20.661	748	685	47	155
Glioblastoma (n=91)	601	453	223	-	8
Pulmão (n=188)	623	1013	348	-	26
Genómico					
Leucemia mieloide aguda	-	500-1000	10	Não aplicavel	10

A maioria das neoplasias apresentam instabilidade cromossômica (CIN), caracterizada pelo número de alterações ao longo do tempo em células tumorais, comparando com as células normais. Apesar de CIN ser uma das principais causas de instabilidade genômica, outras formas de instabilidade incluem a instabilidade de microssatélites (MSI ou MIN), caracterizada pela expansão de repetições de oligonucleótidos, presentes em sequências de microssatélites.⁶⁹

Gorgoulis *et al.*⁷¹ averiguaram as lesões pré-cancerosas humanas, com a ativação dos oncogenes e verificaram que a instabilidade genômica afeta preferencialmente os locais mais susceptíveis.⁷¹ Estes autores, afirmam que quando ocorre uma estimulação aberrante da proliferação celular, desencadeia-se stress de replicação de DNA. Este stress, através da formação de DNA DSBs (quebra de cadeia dupla), pode ativar o mecanismo de controlo de danos no DNA, parando o ciclo celular para correção dos mesmos ou levando à apoptose, funcionando assim como um supressor de tumor. No caso das células que apresentam defeitos na manutenção e reparação do genoma, há uma probabilidade de que esses defeitos na reparação do DNA DSB levem a desequilíbrios e instabilidade genômica. Quando p53 se encontra inativada, as células perdem a capacidade de reparação de erros, escapando dos seus efeitos apoptóticos e/ou senescência, e a lesão pré-cancerosa pode evoluir para cancro. (Figura 6).⁶⁹⁻⁷²

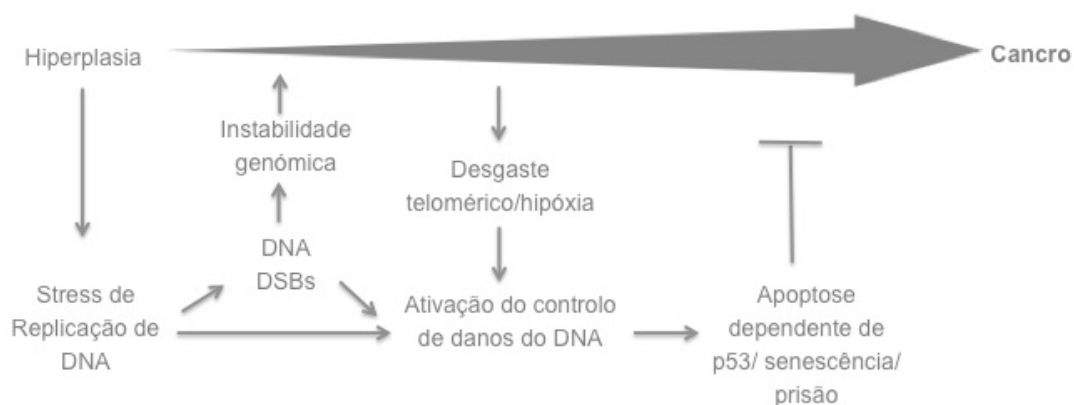


Figura 6 – Modelo da ativação do controlo de danos do DNA no cancro. Figura adaptada de Gorgoulis V. G., et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 907–913 (2005).⁷¹

Mais recentemente, com a evolução das técnicas de sequenciação de DNA, revelaram-se padrões distintos de mutações de DNA em diferentes tumores. Desta forma, através destas técnicas é possível verificar prevalência de mutações aleatórias. Embora as mutações variem drasticamente entre diferentes tumores, a

instabilidade genómica é inerente à maioria das células tumorais humanas.⁷³

1.2.7. Promoção da inflamação

Em 1863, Virchow afirmou que a origem do cancro poderia estar associada a locais com presença de inflamação crónica. Isto aconteceria devido à presença de substâncias irritantes, lesões tecidulares e inflamação, que desencadeavam a proliferação celular.^{74,75}

Durante a lesão tecidular associada ao ferimento, há um aumento da proliferação celular, enquanto ocorre o processo de regeneração do tecido agredido. Após a expulsão do agente agressor e a reparação estar completa, tanto a proliferação como a inflamação diminuem. Em microambientes ricos em células inflamatórias e fatores de crescimento/sobrevivência, as células continuam com o processo de proliferação.^{75,76}

Nos últimos anos, a compreensão do cancro tem vindo a evoluir apoiando a hipótese de Virchow. Cerca de 15% dos cancros têm origem infecciosa e a inflamação é um componente importante dessas infeções crónicas. Resumindo, existem vários tumores onde a inflamação é um fator no seu desenvolvimento, entre eles temos o cancro da bexiga, do cérvix, dos ovários entre outros (Figura 7).⁷⁴

Maligñidade	Estímulos inflamatórios /Condições
Bexiga	Esquistossomose
Cervical	Papilomavirus
Ovários	Doença inflamatória pélvica/talco/ remodelação do tecido
Gástrico	Gastrite induzida por <i>H pylori</i>
Linfoma MALT	<i>H pylori</i>
Osofágico	Metaplasia de Barrett
Colorectal	Doença inflamatória intestinal
Hepatocelular	Virus da Hepatite (B e C)
Brônquico	Silica, amianto e fumo do tabaco
Mesotelioma	Amianto
Sarcoma de Kaposi	Herpesvirus humanos tipo 8

Figura 7 – Associações entre a inflamação e o risco de desenvolvimento de cancro **Fonte:** Balkwill, F., & Mantovani, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545 (2001)

A imunidade tem um papel importante na defesa do nosso organismo. A primeira linha de defesa é a imunidade inata, apresentando mecanismos celulares e bioquímicos protetores contra organismos patogénicos, respondendo de forma rápida às infeções. Para além da imunidade inata, também existe a imunidade específica, que consegue distinguir diferentes substâncias. A imunidade específica

pode ser do tipo humoral, mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B e pode ainda ser do tipo celular, sendo mediada por linfócitos T.⁷⁷

A partir dos mecanismos de escape imuno-tumoral, concebidos pela teoria de “imunossurveillance” criada por Ehrilch, Schreiber *et al.* desenvolveram a hipótese de “Imunoediting”. Esta hipótese refere que o nosso sistema imunitário não protege só o hospedeiro contra a carcinogénese, mas pode também promover o crescimento tumoral. De acordo com a teoria de Imunoediting, o processo de “edição imunitária” divide-se em três etapas. A primeira, é a fase da eliminação, onde as células inatas e específicas reconhecem e destroem o tumor, a segunda é a fase do equilíbrio, onde o tumor e o sistema imunitário entram em equilíbrio dinâmico e a terceira, ocorre quando existe uma perturbação no equilíbrio imuno-tumoral, onde as células que reconhecem e destroem o tumor, vão sofrer alterações desencadeando o desenvolvimento tumoral.^{78,79}

A inflamação associada ao cancro, apresenta células e mediadores inflamatórios nos tecidos tumorais tais como as quimiocinas, as citocinas e as prostaglandinas. Estas células estão presentes no microambiente da maioria dos tumores. A associação da inflamação ao cancro pode ainda ser dividida em duas vias, a extrínseca e a intrínseca e as diferenças entre elas dependem das condições a que estão sujeitas.

A via intrínseca é desencadeada por alterações genéticas que causam inflamação e neoplasia, nomeadamente, inativação de genes supressores de tumores, ativação de oncogenes e rearranjo ou amplificação cromossómica. No caso dos oncogenes, o RET é um importante oncogene que codifica um receptor de proteínas tirosina-quinases. A ativação de RET induz a transcrição que por sua vez desencadeia a produção de mediadores inflamatórios, conduzindo a um microambiente inflamatório em tumores. Relativamente à via extrínseca, esta é desencadeada por condições inflamatórias que aumentam o risco de cancro.

Ambas as vias convergem ativando fatores de transcrição, principalmente o NF- κ B (fator nuclear kappa B), STAT3 (Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) e HIF1 α (Fator indutível por hipóxia 1 α). Estes três fatores de transcrição coordenam a produção de citocinas, quimiocinas e COX2 (ciclooxigenase 2) que produzem prostaglandinas. A produção destes mediadores inflamatórios recruta leucócitos principalmente da linhagem mielomonocítica. Quanto às citocinas, ativam os fatores essenciais para a transcrição em células inflamatórias, estromais e tumorais, conduzindo ao aumento da produção de mediadores inflamatórios. Estes desencadeiam um microambiente inflamatório associado ao cancro, ocorrendo então a proliferação celular, a angiogénese, a

inibição da imunidade específica, a alteração das respostas a hormonas e agentes quimioterapêuticos e a migração das células tumorais, invasão e metástase (Figura 8).⁸⁰

Concluindo, o estado inflamatório das células pré-malignas e malignas, ativado pelas células do sistema imunitário, promove a progressão do tumor, auxiliando as células tumorais a obterem propriedades essenciais à sua sobrevivência, tornando-o mais agressivo.^{17,81}

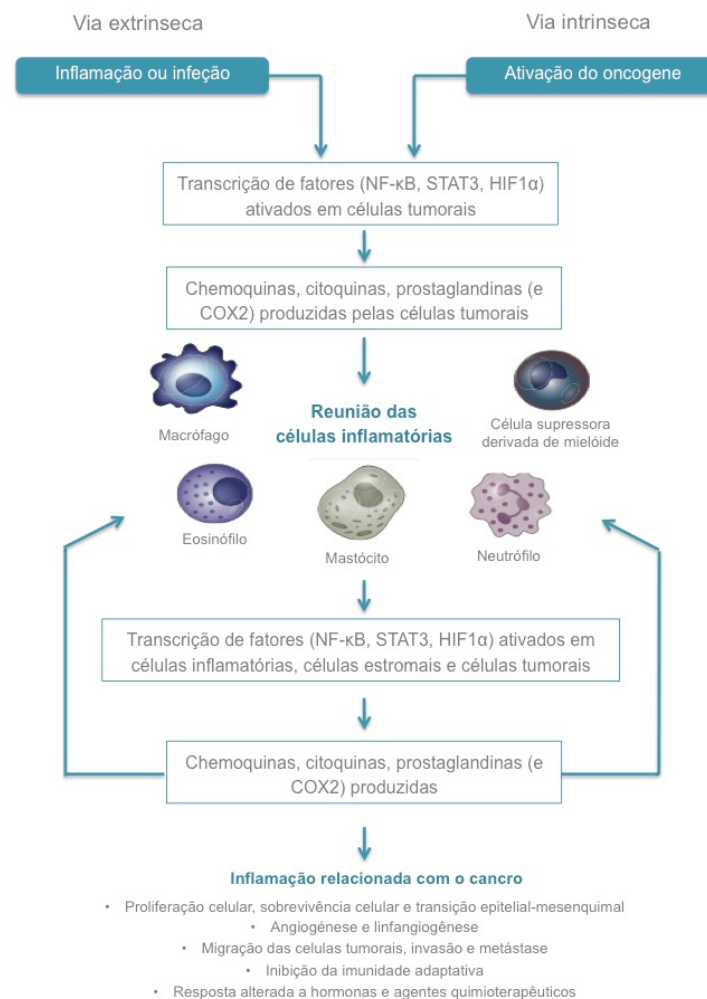


Figura 8 – Caminhos que conectam a inflamação ao cancro. Figura adaptada de Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).

1.2.8. Impedimento da destruição imune

O envolvimento do sistema imunitário na resistência à formação e progressão de tumores é uma questão que ainda não se encontra resolvida. Pensa-se que os tecidos e as células são constantemente monitorizados pelo sistema

imunitário, sendo este responsável pela eliminação da maioria das células tumorais de neoplasias em iniciação. O desenvolvimento de tumores sólidos, advém do escape ao sistema imunitário ou da sua capacidade de limitarem a detecção imunológica, evitando assim a sua erradicação.¹⁵

Em 1990 ocorreram progressos na identificação de antígenos expressos por tumores, tendo-se verificado que a maioria dos antígenos expressos pelas células tumorais não estavam exclusivamente presentes nessas células mas também se encontravam expressos em células normais. Desta forma, pensou-se que os maiores obstáculos do sistema imunitário contra os tumores, eram os mecanismos de tolerância das células T contra os antígenos auto-tumorais.⁷⁹

Como vimos anteriormente, a imunidade específica pode ser humoral ou celular e é na imunidade celular que se enquadram os linfócitos T. Estas células podem ser do tipo auxiliar ou do tipo citotóxico. O linfócito T CD4⁺ (célula T com proteína CD4 (grupo de diferenciação 4)), tem a função de auxiliar a defesa contra o organismo estranho, enquanto que o linfócito T CD8⁺ (célula T com proteína CD8 (grupo de diferenciação 8)) tem a função de o eliminar.⁷⁷ Deste modo, sabe-se que os tumores possuem antígenos reconhecidos por linfócitos T autólogos.⁸²

Embora a existência de células T específicas para antígenos tumorais seja um pré-requisito para respostas imunitárias anti-tumorais, não se sabe o caminho que estas células seguem durante a progressão do tumor. Bogen (1996) e Levitsky (1998), após estudos independentes, demonstraram que as células T CD4⁺ específicas para o antígeno tornaram-se tolerantes durante o crescimento tumoral in vivo.^{83,84}

Estudos feitos em ratinhos, permitiram verificar que nos casos onde havia deficiência de componentes do sistema imunitário, imunodeficientes, os tumores desenvolveram-se mais rapidamente ou, eram mais frequentes, do que nos ratinhos imunocompetentes. As alterações feitas nos componentes do sistema imunitário baseavam-se em deficiências nos linfócitos T citotóxicos CD8⁺, das células auxiliares CD4⁺ ou das células NK e desencadearam um aumento da incidência de tumores.^{85,86}

O'Carroll⁸⁴ concluiu que a resposta imunitária pelos linfócitos T começa logo que estas células começam a interagir com o tumor. Diversos estudos evidenciam a capacidade do tumor escapar ao sistema imunitário, reduzindo a função das células T, desencadeando a imunossupressão no organismo de forma a que o tumor consiga progredir. Contudo, os fatores desencadeadores destas alterações ainda não são bem conhecidos.⁸⁴

Vajdic⁸⁷ após realizar experiências em ratinhos transplantados verificou um risco bastante aumentado de cancro, devido à redução da capacidade imunitária.

Como vimos anteriormente, as células tumorais ao contactarem inicialmente com os linfócitos T, vão provocar-lhes alterações na modificação da sua função, levando à imunossupressão e consequente progressão e desenvolvimento tumoral. Indivíduos transplantados apresentam um risco aumentado de desenvolver cancro, uma vez que este processo de redução da função das células T não acontece pela mesma razão, mas sim, porque o organismo de um indivíduo transplantando, encontra-se imunodeficiente quando comparado com um organismo saudável.⁸⁷

Experiências de transplantes em ratinhos, verificaram que células cancerosas provenientes de ratinhos imunodeficientes, são incapazes de iniciar tumores secundários em hospedeiros imunocompetentes. Contrariamente, células tumorais derivadas de ratinhos imunocompetentes, conseguem iniciar tumores secundários em hospedeiros imunocompetentes.^{85,86}

Os próprios tumores, após interação com o sistema imunitário, têm a capacidade de desativar elementos deste sistema, ou de reduzir a função das mesmas, e desta forma, impedir a destruição imunológica. Existem algumas teorias que referem que o próprio tumor recruta células inflamatórias com a capacidade de suprimir o sistema imunitário, como é o caso dos linfócitos T reguladores (CD4⁺) e das células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs). Desta forma, estes componentes podem suprimir a ação dos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) que destruiriam o tumor.⁸⁸

1.2.9. Reprogramação do metabolismo energético

O cancro apresenta diversas capacidades que permitem a sua sobrevivência e progressão. Para além das referidas anteriormente, existe outra característica do cancro bastante importante, que é a reprogramação do metabolismo energético. A proliferação celular em neoplasias não ocorre apenas por descontrolo da regulação da proliferação celular, mas também pelos ajustes do metabolismo energético que irão estimular o crescimento e divisão celular.¹⁵

A capacidade proliferativa requer um elevado consumo de energia, um elevado nível de nutrientes e uma atividade sintética de biomassa (proteínas, lípidos e ácidos nucleicos) bastante elevada. Desta forma, é de esperar que as células tumorais apresentem alterações ao nível do seu metabolismo energético. Também se verifica que os sinais estimulantes da proliferação celular devem participar no reajuste da atividade metabólica permitindo que as células normais comecem a proliferar.^{89,90}

Nos anos vinte, Otto Warburg descreveu o “Efeito Warburg”, tendo

observado que a mudança metabólica mais conhecida nas células cancerosas é a sua dependência da glicólise aeróbia em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial, procurando gerar a energia suficiente para os processos celulares. Assim, as células tumorais secretam a maior parte do carbono, derivado da glicose, como lactato em vez da sua oxidação completa. Embora a energia proveniente da glicólise seja considerada ineficiente quando comparada com a fosforilação oxidativa, esta produção consegue ser cerca de cem vezes mais rápida, conseguindo uma reprodução rápida das células tumorais. Contudo, a causa desta alteração metabólica ainda permanece incerta e as células tumorais também conseguem controlar a biossíntese lipídica e os processos anabólicos, apresentando elevados níveis de aminoácidos.^{90,91}

Estudos recentes permitiram descobrir que elevados níveis de lactato, provenientes da glicólise, podem suprimir a proliferação de linfócitos T citotóxicos, responsáveis pela destruição tumoral, contribuindo dessa forma para a progressão do tumor. Assim, o tumor consegue escapar ao sistema imunitário e progride. Contudo, as implicações e consequências da utilização do lactato pelo tumores ainda não são totalmente conhecidas.^{89,92}

Num tumor, as células cancerosas podem estar divididas em duas subpopulações: as células dependentes da glicólise (“Warburg-effect”), que secretam lactato e, as células que importam e utilizam o lactato produzido pelas células anteriores, como principal fonte de energia. Existe assim cooperação entre estes dois tipos de células, ou seja, as células tumorais em hipóxia são dependentes da glicose para o seu metabolismo e produzem lactato que posteriormente, é utilizado como combustível para o metabolismo das células seguintes.

Também tem sido demonstrado que a associação da ativação de oncogenes (RAS (RA_t Sarcoma vírus)) e os genes supressores de tumores (TP53) aumenta a glicose. Conclui-se então que tanto o oncogene RAS como a hipóxia, podem aumentar os níveis de fatores de transcrição HIF-1a e HIF2a que, consequentemente, aumentam os níveis de glicólise.^{15,90,92,93}

O reajuste do metabolismo energético é desencadeado por proteínas envolvidas na programação das principais características do cancro. A reprogramação do metabolismo energético é então uma das dez importantes capacidades/características que as células tumorais adquirem para o seu desenvolvimento e progressão. Uma vez que as células cancerosas adquirem uma capacidade de reprogramação do seu metabolismo, passando a depender da glicólise, conseguem desencadear uma proliferação mais rápida e eficiente, na

progressão do tumor.

1.2.10. Metastização

Atualmente, o aspeto mais temível ao nível do cancro é a sua metastização, que se dissemina na circulação sanguínea ou linfática, tornando-se mais difícil o seu tratamento. Desta forma, para concluir as dez características do cancro definidas por Hanahan e Weinberg, irá abordar-se a metastização. Esta característica do cancro foi caracterizada pelos autores em 2000, como uma das capacidades adquiridas pelo cancro. Apesar de todas as dez características serem de extrema importância, o presente trabalho irá focar-se predominantemente na capacidade do cancro se metastizar.

Dá-se o nome de metastização à migração de células do tumor primário para novos locais, formando tumores secundários. As metástases são malignas uma vez que neoplasias benignas não têm esta capacidade. Uma neoplasia com um elevado ritmo de crescimento, torna-se rapidamente agressiva, aumentando a probabilidade de metastizar. Contudo, não acontece sempre desta forma, uma vez que há casos de neoplasias menores que também desenvolvem metastização. Apesar da elevada capacidade replicativa e proliferativa do tumor ser uma característica importante para o desenvolvimento de metástases, nem sempre acontece nestas condições.⁹⁴

A principal causa de morte em doentes com cancro sólido não é o crescimento avançado do tumor primário, mas sim a disseminação das suas lesões secundárias. O conhecimento molecular do processo metastático é ainda limitado e apesar dos progressos desenvolvidos na prevenção e detecção precoce do cancro, um número significativo de tumores malignos apresenta metástases ou tem um elevado risco destas complicações, desde o diagnóstico. A principal barreira para o tratamento das metástases é a heterogeneidade biológica das células do tumor primário e das células metastáticas.⁹⁵⁻⁹⁸

Stephen Paget, em 1889, propôs a hipótese “Seed and soil” para explicar quais são os órgãos onde existe esta disseminação. Os seus estudos demonstraram que a metástase não ocorre de forma aleatória, mas sim que, certas células tumorais têm uma afinidade específica para o ambiente de certos órgãos, concluindo que a metastização apenas ocorre quando existe compatibilidade entre as células tumorais e o local. Anos mais tarde, em 1929 James Ewing referiu que a disseminação metastática ocorre unicamente devido a fatores mecânicos. Já em 1951 Coman *et al.* vieram confirmaram a teoria de Ewing, descobrindo, que logo

após a injeção de células tumorais em animais, se verificou a ocorrência de produção de metástases em alguns órgãos viscerais. Estes autores verificaram que nos órgãos onde ocorreu metastização, as células tumorais encontravam-se alojadas nos capilares enquanto, que nos órgãos nos quais esta metastização não se verificou, as células tumorais encontravam-se alojadas nas arteríolas. Desta forma, confirmaram a associação das metástases a fatores mecânicos proposta por James Ewing. Um ano mais tarde, Lucke e a sua equipa compararam o carcinoma hepático com o pulmonar e verificaram que pacientes com cancro apresentavam uma maior taxa de metástases hepáticas quando comparado com as pulmonares.^{97,99}

Zeidman *et al.* descobriram que o comportamento das células tumorais é determinante para o desenvolvimento de metástases. Certas células tumorais têm a capacidade de conseguirem distorcer-se passando pelos tubos capilares, contrariamente a outras que ficariam retidas. Destas células sem capacidade de distorção, sabe-se que uma percentagem irá metastizar e a restante morrerá.

Durante várias décadas a teoria de James Ewing prevaleceu, até que em 1970, após estudos experimentais em ratinhos, se verificou que a retenção das células tumorais em órgãos distantes poderia efetivamente ocorrer. Contudo, a proliferação e o crescimento em lesões secundárias eram influenciadas por células específicas dos órgãos em questão. Também Weiss e Sugarbaker concluíram que a disseminação metastática ocorria não só devido a fatores mecânicos mas também devido a fatores anatómicos, como a circulação venosa eferente ou a drenagem linfática aos gânglios linfáticos regionais. Assim, um ambiente do órgão alvo facilitador da sobrevivência das células tumorais e ainda as características apropriadas destas células que colonizam o órgão alvo, são aspetos importantes para a preferência da metastização das células em determinados órgãos. Diferentes tipos de tumores têm diferentes locais de metástases. No caso do cancro da mama, a metastização dá-se preferencialmente nos ossos, pulmões e fígado.^{97,100,101}

No início da década de oitenta, Isaiah Fidler com base na hipótese de Leighton em 1965, que previa que as metástases surgiam de subpopulações definidas geneticamente determinadas em tumores primários, realizou o seu estudo no comportamento metastático de células de melanoma B16 cultivadas, que foram injetadas por via IV (intravenosa). Fidler mostrou que as células derivadas de “outgrowths” destas células (metástases) têm um potencial metastático mais elevado do que as derivadas da linha celular do tumor primário. Estas descobertas permitiram o desenvolvimento do modelo que propunha que a maioria das células tumorais originais tinham um potencial metastático baixo, e que durante as fases

tardias do desenvolvimento tumoral, as células, através de mutações somáticas adicionais, adquiriam uma capacidade metastática superior.^{98,102}

O desenvolvimento de metástases ocorre devido à predisposição das células tumorais para a metastização, contudo o ambiente dos tecidos do local metastático também tem um papel importante neste processo. Deste modo um determinado órgão pode apresentar uma maior propensão para a adesão e invasão de células tumorais. Isto acontece pelas a interações tumor-hospedeiro, fatores de crescimento e outros fatores relacionados com o tumor. Sabe-se que estes fatores, que facilitam a adesão do tumor ao órgão, têm vindo a ser investigadas como potenciais alvos de terapia antimetastática.⁹⁵

O processo de metastização foi explicado em 2002 por Fidler e consiste num processo com diversas etapas sequenciais e ligadas entre si. Como se verificou anteriormente, o crescimento das células tumorais ocorre de forma progressiva com a ajuda de nutrientes fornecidos por difusão simples que permitem a expansão da massa tumoral. Sendo a angiogenese uma característica importante do cancro, tal como foi referida por Hanahan e Weinberg em 2000, permite que a massa tumoral se consiga propagar. Para isto, é necessária a síntese e a secreção de fatores angiogénicos que permitem a formação da rede capilar, a partir do tecido hospedeiro que rodeia as células tumorais. Após a formação da rede capilar, segue-se a etapa de invasão local do estroma do hospedeiro por algumas células tumorais. Esta invasão acontece devido às paredes finas das vénulas e dos canais linfáticos, permitindo uma fácil penetração por estas células, sendo esta a via de entrada na corrente sanguínea/linfática das células tumorais. A maioria das células tumorais são destruídas. Contudo, as que sobrevivem à circulação, ficam presas nos capilares de órgãos distantes aderindo ou às células endoteliais capilares ou à membrana basal sub-endotelial. O extravasamento ocorre após esta adesão às paredes dos vasos devido a mecanismos semelhantes aos do processo de invasão. Após a retenção destas células nos órgãos, ocorre a proliferação das mesmas, dando-se por completo o processo metastático. O processo de metastização pode repetir-se no órgão que foi metastizado, uma vez que as células metastáticas tumorais podem continuar a crescer, e desenvolver uma rede vascular que permite que essas metástases secundarias entrem novamente na corrente sanguínea e, desta forma dê continuidade ao processo (Figura 9).⁹⁷

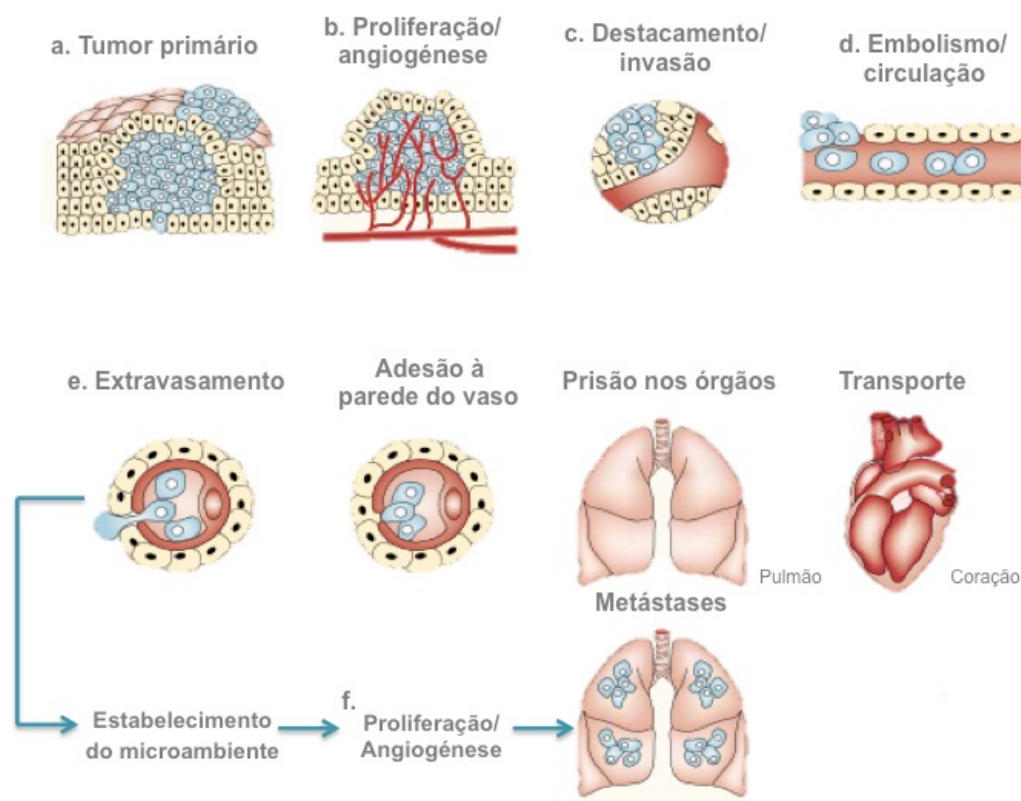


Figura 9 – Passos Principais na Formação da Metastização. Figura adaptada de imagem de Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458 (2003)

Durante as últimas décadas, têm sido abordadas várias hipóteses, para explicar os diferentes comportamentos das células tumorais. Um estudo em doentes com lesões “benignas” como é o caso dos pólipos do cólon verificou que estes apresentam uma maior incidência de desenvolvimento de carcinoma do cólon. Foulds estudou a transição das lesões benignas (não metastáticas) para um tumor maligno (metastático). Este autor definiu a “progressão tumoral”, como o desenvolvimento neoplásico através de alterações nas células neoplásicas, mas Nowell supôs que os tumores adquirem instabilidade genética, o que pode permitir gerar diferentes variantes. Por tudo isto pensa-se que a origem das células metastáticas advém de mutantes do tumor primário. Um mutante que seja capaz de ultrapassar todas as etapas necessárias para desencadear metástases evolui e torna-se num subclone de disseminação dominante. A forma como este deriva ainda não é bem conhecida, mas a capacidade de desencadear metástases tem uma componente genética hereditária. A visão deste investigador determina que os tumores são mais propensos a sofrer mutações e que por essa razão são

geneticamente instáveis ou hipermutáveis.¹⁰³ As células tumorais apresentam uma heterogeneidade biológica, devido à elevada capacidade de evolução das células tumorais, bem como, devido à seleção do processo metastático.⁹⁷

1.2.10.1. Microambiente Tumoral

Como vimos anteriormente, o processo de metastização é um processo complexo e dependente quer das características das células neoplásicas, quer das condições do microambiente tumoral (TME), que emerge no decurso da progressão tumoral, como resultado das interações com o hospedeiro. Este ambiente é constituído pelas próprias células do tumor, pelas células endoteliais, pelos pericitos, pelas células imunes e pelos fibroblastos associados ao tumor.

As células imunitárias presentes no tumor incluem os Linfócitos T e B, e as células dendríticas (DC) que medeiam as respostas da imunidade adaptativa. Neste TME, ainda estão presentes células mediadoras de respostas da imunidade inata, tais como os macrófagos, os leucócitos e as células Natural-Killer (NK). As células NK são a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos, contudo, em meio tumoral são pouco frequentes. Cheng Sun et al. (2012) verificaram que em pacientes com cancro, o fator de crescimento TGF- β 1 regulava positivamente a expressão de proteínas p15 e p21, importantes na paragem ciclo celular, comprometendo a função de NK, e desta forma, o tumor seria capaz de evitar o recrutamento destas células.^{15,104–107}

Os linfócitos infiltrados no tumor (TIL) contém células T do tipo CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, como vimos anteriormente, pertencendo ao microambiente tumoral. Estas células são específicas para os antígenos tumorais. Contudo, embora acumulações destes linfócitos T no tumor possam ser consideradas uma vigilância do hospedeiro, elas muitas vezes não são eficazes na detecção do crescimento tumoral.

Em 2001, Edward Woo verificou que uma parte dos fenómenos supressivos podem dever-se à secreção de citocinas imunossupressoras, tal como o TGF- β que pode desempenhar um papel importante na progressão tumoral.^{104,108}

O microambiente tumoral apresenta ainda macrófagos associados a tumores (TAM) mediadores da resposta inata, que apresentam funções diferentes, sendo o seu papel fagocitar elementos estranhos ao organismo, que neste caso seriam as células neoplásicas. Contudo, o tumor tem a capacidade de reprogramar estas células, de forma a que estas libertem citocinas inibitórias como o IL-10, as prostaglandinas ou as espécies reactivas de oxigénio (ROS) para que inibam as funções dos linfócitos. Para além dos macrófagos, os tumores humanos são ainda

enriquecidos por células supressoras mieloides (MSC), que se diferenciam em diversas células, entre as quais os fibroblastos. Do pouco que se sabe sobre MSC, pensa-se que estas permitem o desenvolvimento tumoral. As células inflamatórias presentes no TME libertam moléculas de sinalização importantes para o desenvolvimento tumoral, nomeadamente VEGF, fatores pro-angiogénicos, quimiocinas, e citocinas que aumentam o estado inflamatório. Estas células podem produzir enzimas pro-angiogénicas e/ou pró-invasoras como as MMPs (metaloproteinases da matriz). Os pericitos que vão ser recrutados, permitindo a vascularização fundamental na progressão tumoral. Assim, um estudo de Oana Draghiciu ocorrido em 2015, demonstrou a correlação existente entre a inibição da migração tumoral por MDSC (células supressoras derivadas da linhagem mieloide) e a diminuição da angiogénese tumoral.^{17,104,109}

Os pericitos, em tecidos normais, fornecem sinais de suporte ao endotélio quiescente. Pode dizer-se que a integração anormal destas células na parede capilar, conjuntamente com a sua cobertura deficiente, é parcialmente responsável pelas anomalias vasculares que desencadeiam a metastização. A angiopoetina 1 secretada pelos pericitos, emite sinais estabilizadores anti-proliferativos para os receptores de superfície das células endoteliais (Tie2). Alguns estudos demonstraram que doentes com metástases no fígado apresentavam um aumento do número de pericitos, ou seja, uma vez ativados estavam envolvidas no estabelecimento inicial de micrometástases e na formação de uma rede vascular tumoral. Os pericitos estão envolvidos tanto no tumor primário, como no órgão metastizado, isto é, podem limitar a intravasação do tumor primário, mas também podem facilitar o extravasamento no local de metastização. O tumor pode deste modo tirar partido das células do microambiente tumoral, manipulando-as em benefício próprio.^{15,110,111}

Para além de todas as células anteriormente mencionadas, o microambiente tumoral inclui também os fibroblastos. Estas células encontram-se em diversos locais no espectro do carcinoma, sendo em muitos casos, as células maioritárias. Os fibroblastos têm um papel bastante importante na matriz extracelular (ECM) dos tecidos, uma vez que após serem incorporados, sintetizam muitos componentes destacam-se a fibronectina e os colagénios do tipo I, III e V. Estes regulam ainda a inflamação, participam no processo de diferenciação epitelial e na cicatrização. Para além de todas estas funções, os fibroblastos são ainda responsáveis pela secreção de enzimas que regulam a degradação de ECM e pelos fatores de crescimento, que influenciam as células epiteliais vizinhas. O papel destas células no cancro ainda permanece sem resposta, não se sabendo ainda se os fibroblastos induzem a

progressão do tumor, se protegem estas lesões, ou se contribuem no processo de metastização. Algumas experiências indicam que estas células têm um papel importante na definição da taxa e extensão da progressão do tumor. As células mais abundantes no estroma tumoral são os fibroblastos associados ao cancro (CAF), que foram recrutados como normais, mas que são ativados de forma a tornarem-se miofibroblastos. Alguns estudos demonstraram que em pacientes com cancro da mama, os CAFs apresentavam uma maior atividade migratória do que os de controlo normal, devido à prévia ativação. A ativação continua de CAFs, provoca a granulação do tecido constituído por fibroblastos e ainda quantidades excessivas de ECM.^{15,107,112}

Orimo et al. (2005) mostraram que a associação de CAFs e das células tumorais origina um aumento do crescimento tumoral. Este facto indica que os fibroblastos estão envolvidos na iniciação e desenvolvimento tumoral. Posteriormente, diversos estudos demonstraram o papel de CAF no cancro, estimulando o crescimento, a invasão tumoral e a participação no processo de desenvolvimento de metástases.^{107,113,114}

Como podemos verificar o desenvolvimento e a progressão do cancro não ocorre exclusivamente devido às células tumorais, mas também está associado ao seu microambiente com as diversas células que o constituem. Contudo, apesar de muitas outras perguntas terem sido respondidas, ainda existem muitas que permanecem sem resposta e para as se continua a procurar respostas.

Capítulo 2 – Tratamento

O cancro é a doença da atualidade, existem cada vez mais novos casos, e apresenta uma elevada mortalidade. Por esta razão o consumo de medicamentos oncológicos tem sofrido alterações com os anos. O elevado ritmo de progressão científica e técnica, desencadeou um aumento da quantidade utilizada de medicamentos e dos custos inerentes. Os desafios associados a esta doença estão relacionados com o órgão específico, uma vez que existem grandes diferenças fisiopatológicas entre diferentes órgãos. A grande capacidade das células tumorais, de alterarem as células do nosso organismo de forma a que trabalhem a seu favor, torna mais complicado o seu tratamento. Quando toca ao tratamento do cancro, existem vários aspetos que temos que ter em consideração nomeadamente as características do seu fenótipo maligno, bem como a invasão e a metastização.^{4,115,116}

Atualmente, praticamente metade das substâncias químicas em desenvolvimento, destina-se ao tratamento do cancro. Ensaio clínico de medicamentos antitumorais, estejam atualmente em uso clínico ou sejam novos fármacos, incluem pacientes com doença metastática, de forma a avaliar se estes medicamentos reduzem as lesões estabelecidas, se prolongam a sobrevida global do paciente (OS) ou a sobrevida livre de progressão (PFS). Muitos dos fármacos aprovados pela FDA para o tratamento do cancro, revelam-se eficazes na prevenção da metastização mas não no tratamento concreto da doença metastática. Muitos destes fármacos não foram testados em modelos pré-clínicos metastáticos, uma vez que a maioria dos medicamentos visam apenas o crescimento do tumor primário e não a metástase. Assim, doentes com neoplasia, sem evidência de metástases, seriam tratados contra o crescimento celular evitando a colonização metastática tendo como parâmetros de análise o OS e PFS. Um parâmetro importante a ter em consideração durante os ensaios clínicos, são os efeitos adversos, uma vez que os doentes metastáticos apresentam-se mais débeis. Apesar de tanto os doentes com neoplasias como os doentes metastáticos, terem uma grande susceptibilidade em adquirir efeitos adversos, os pacientes com doença metastática apresentam-se mais condicionados, no que diz respeito ao sistema imunitário.

Estudos recentes têm demonstrado que fármacos anticancerígenos podem promover a metastização. Diferentes fármacos aprovados, como o paclitaxel para o cancro da mama, cisplatina para o cancro dos ovários, anti-androgénios para o cancro da próstata, everolimus para o cancro neuroendócrino pancreático, têm

estimulado as metástases em modelos pré-clínicos. Um dos efeitos indesejados da quimioterapia ou da radioterapia é a indução de um microambiente promotor de metástase, isto porque existe uma propensão natural para as células estaminais do cancro (CSCs) e as células tumorais disseminantes (DTCs), migrarem para os locais receptores de metástases distantes. Desta forma, deveriam ser incluídos nos protocolos de tratamento oncológico padrão, estratégias anti-metástase. Contudo, isto não ocorre da forma como desejamos, uma vez que estes compostos anti-metástase, não se encontram disponíveis atualmente.^{117–122}

Após tratamento oncológico, um microambiente permissivo à metastização é criado, onde circulam CSCs e DTCs sobreviventes ao tratamento. Este microambiente é composto por factores pró-metastáticos e pró-sobrevivência como quimiocinas SDF-1 (Fator derivado de células do estroma), fatores de crescimento HGF/SF (Fator de crescimento dos hepatócitos/fator de dispersão), esfingofosfolípidos bioativos (S1P (Esfingosina-1-fosfato) e C1P (Ceramida-1-fosfato)), substâncias de alarme (ATP (trifosfato de adenosina) e UTP (trifosfato de uridina)). Paralelamente, em resposta ao dano, cascatas proteolíticas são ativadas, como a cascata de coagulação (CoaC), a do complemento (ComC) e a cascata fibrinolítica (FibC) que consequentemente irão aumentar a metastização das células tumorais, que sobreviveram à quimioterapia ou radioterapia. Devido à capacidade das células tumorais sobreviventes da quimioterapia ou radioterapia conseguem facilmente chegar a tecidos mais propensos a serem invadidos por metástases, nomeadamente os ossos, pulmões, fígado e cavidade abdominal e pélvica, um dos objetivos futuros da ciência, será chegar a fármacos anti-metástase eficazes (Figura 10).¹²⁰

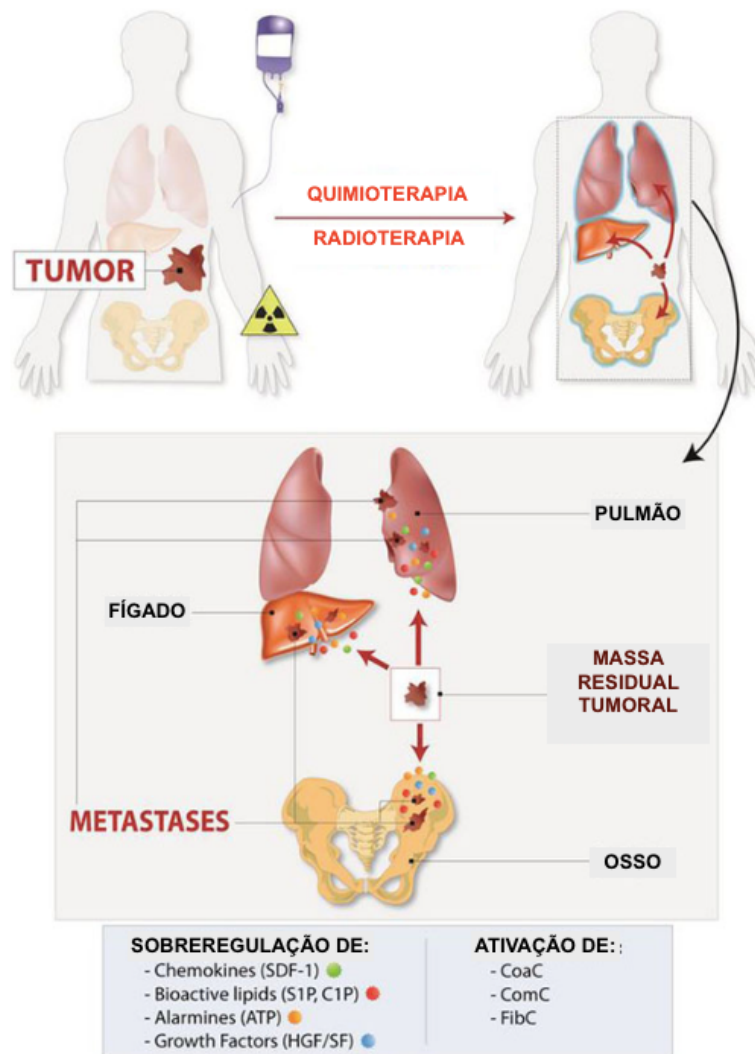


Figura 10 – Indução do microambiente receptivo a metástases, em diferentes órgãos, após tratamento por quimioterapia ou radioterapia. **Fonte:** Pool, S. *et al.* mTOR inhibitor RAD001 promotes metastasis in a rat model of pancreatic neuroendocrine cancer. *Cancer Res.* **73**, 12–18 (2013).

3. Fármacos Anti-Metastização

Tendo a doença metastática o impacto que tem atualmente, a ciência tem-se focado na investigação e desenvolvimento de medicamentos inovadores capazes de reduzir a incidência desta doença. Desta forma, o presente trabalho, daqui para diante irá focar-se nos fármacos anti-metastização que se encontram em desenvolvimento.

3.1. Prática Clínica

3.1.1. Anticorpo Monoclonal Humanizado – Denosumab

Com o propósito de descobrir fármacos antimetastização, o anticorpo monoclonal humanizado Denosumab, tem sido investigado por diversos autores. Paul Kostenuik e os seus colaboradores em 2009, começaram a investigar a capacidade deste anticorpo atuar no processo de metastização. Kostenuik verificou que este anticorpo monoclonal tinha a capacidade de interromper o processo de metastização óssea. Deste modo, verificou-se que as células tumorais ao chegarem ao osso, conseguem produzir fatores ativadores dos osteoblastos formadores de ossos, para produzir RANKL (Receptor activator do NF- κ B), também conhecido por TNFSF11 (Membro 11 da superfamília de ligandos do TNF). TNFSF11 irá ativar os osteoclastos destruidores do osso e degradar o mesmo. À medida que a matriz óssea é destruída, ela vai produzir fatores como o TGF β , que ativam as células tumorais e reiniciam o ciclo, conduzindo a uma nova destruição da matriz óssea, com consequente produção de TGF β e este ciclo continua sucessivamente. O Denosumab apresenta uma grande afinidade e especificidade para o RANK, ligando-se a este receptor, impedindo a ligação com o seu ligando endógeno. Não havendo a interação receptor-ligando (RANK-RANKL), também não haverá a ativação dos osteoclastos destruidores ósseos, que por sua vez impedem a destruição da matriz.^{8,123}

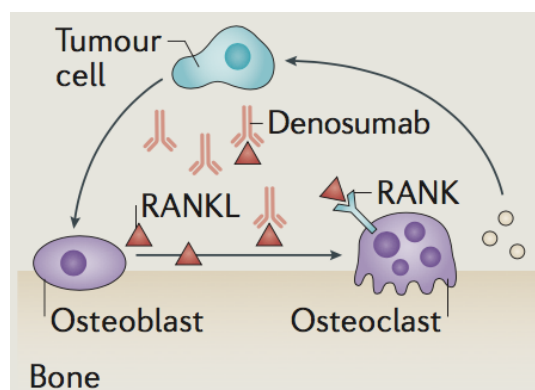


Figura 11 – Modo de atuação de Denosumab. **Fonte:** Steeg, P. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–18 (2016).

Foram realizados varios estudos que confirmam o efeito do denosumab no tratamento de metastases de diversos tipos de cancro. Estes estudos, apresentados seguidamente permitirão mostrar os resultados associados à metastização. Os três primeiros estudos apresentam dosagens iguais e o mesmo termo de comparação (ácido zolendróico). O quarto estudo, compara o denosumab com o placebo, permitindo avaliar a sobrevivência livre de metástases.

Cancro da Mama Metastizado

Em 2010, Alison Stopeck publicou um artigo, em conjunto com os seus investigadores, onde comparou a eficácia do tratamento concumitante de Denosumab e Ácido zolencrónico em doentes com metástases ósseas derivadas de cancro da mama.

Estudo 1 – Denosumab Compared With Zoledronic Acid For Treatment Of Bone Metastasis In Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study

Este estudo foi realizado por Alison Stopeck e avaliou os eventos relacionados com o esqueleto (SRE), tendo sido definidos como uma fratura óssea, resultante da expansão de uma metástase existente ou de uma nova metástase. Este estudo foi realizado em pacientes com adenocarcinoma da mama confirmado histológica ou citologicamente. Estes pacientes foram sujeitos subcutaneamente a 120 mg de denosumab ou intravenosamente de 4 mg de ácido zeledrónico a cada quatro semanas.¹²⁴

Verificou-se que os pacientes tratados com Denosumab atrasaram o tempo

até ao primeiro SRE em 18% comparativamente ao ácido zoledrónico (Figura 12A). O anticorpo monoclonal, reduziu o risco de desenvolver múltiplos SRE em 23%, em comparação com o outro fármaco. (Figura 12B).¹²⁴

Stopeck conseguiu comprovar que o Denosumab é mais eficaz, conseguindo reduzir o risco de SRE e das SREs subsequentes para o cancro da mama. Esta melhoria da eficácia, comparada com o ácido zoledrónico, sugere uma maior inibição da reabsorção óssea induzida pelos osteoclastos, com o denosumab. Este fármaco é também mais seguro que o fármaco de comparação, embora ainda estejam presentes alguns efeitos adversos, nomeadamente, o risco de toxicidade renal. Também se sabe que o uso de bifosfonatos intravenosos, para o tratamento da osteoporose e algumas quimioterapias, estão associadas a um elevado risco de toxicidade renal. O Denosumab é uma boa opção terapêutica para estes casos, uma vez que a sua eliminação não depende da função renal, porque é realizada por catabolismo inespecífico, em células do sistema reticuloendotelial, processo idêntico a outros anticorpos monoclonais. Esta é uma alternativa para doentes com cancro da mama metastático, que anteriormente tenham sido sujeitos a tratamentos de quimioterapia à base de platina, sabendo-se atualmente que estes tratamentos provocam um distúrbio na função renal.¹²⁴

Os resultados de Stopeck apoiam a utilização de denosumab, como uma nova opção terapêutica para o tratamento de metástases ósseas, em pacientes com cancro da mama. Isto porque esta substância demonstrou ser superior ao ácido zoledrónico, atrasando ou prevenindo as SRE e ainda apresentando outras características benéficas para os pacientes, tal como foi referido anteriormente.¹²⁴

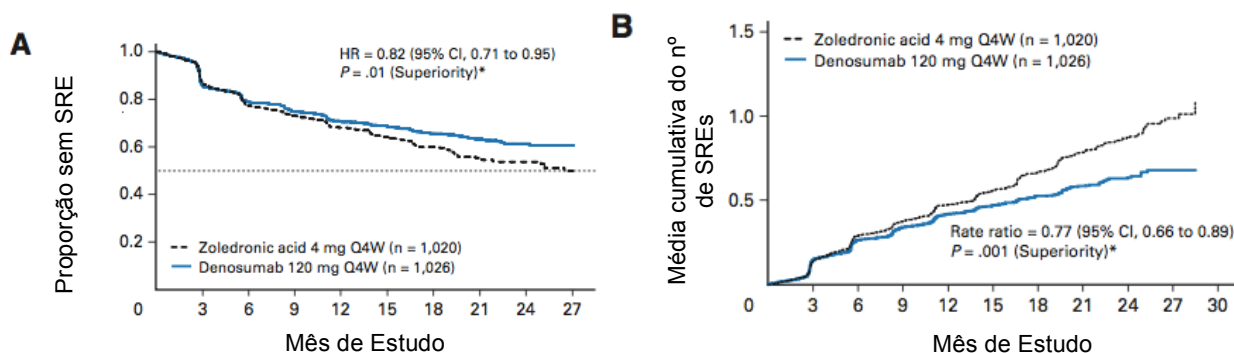


Figura 12 – Estimativas Kaplan-Meier do tempo para o primeiro evento relacionado com o esqueleto (SRE) (A) e para a primeira e subsequente SRE (B). **Fonte:** Stopeck, A. *et al.* Denosumab Compared With Zoledronic Acid for the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *J Clin Oncol* **28**, 5132–5139 (2010).

Cancro da Próstata Metastizado

Um ano mais tarde, em 2011, Karim Fizazi e a sua equipa publicaram outro estudo, semelhante ao anterior, mas neste caso, em pacientes com cancro da próstata que apresentavam evidências de metastases ósseas.

Estudo 2 – “Denosumab Versus Zoledronic Acid For Treatment Of Bone Metastasis In Men With Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized, Double-Blind Study”

Neste estudo os pacientes receberam os mesmos compostos, com a mesma dosagem, dos apresentados no estudo anterior (120 mg denosumab e 4mg ácido zoledrónico), a cada quatro semanas.¹²⁵

O Denosumab atrasou o tempo até ao primeiro evento esquelético (SRE) em 18%, comparativamente ao ácido zoledrónico tal como aconteceu no estudo anterior. A divergência entre os grupos tornou-se evidente logo após três meses de tratamento. O Denosumab também reduziu o risco de desenvolver múltiplos SRE, comparativamente ao ácido zoledrónico. 38% dos pacientes tiveram eventos esqueléticos relacionados com o estudo (SRE) 36% no grupo do Denosumab e 41% no grupo do ácido zoledrónico.¹²⁵

Para este estudo, a tendência do Denosumab ser mais seguro, comparativamente ao ácido zoledrónico, não é tão acentuada, apresentando em ambos os casos 97% de probabilidade de desenvolver um efeito adverso.¹²⁵

Fizazi confirmou o que Stopeck tinha afirmado anteriormente, que o Denosumab atrasa, ou previne tanto o primeiro SRE, como os eventos subsequentes. Mas, neste caso em pacientes com cancro da próstata avançado. Este estudo, é um dos três estudos de fase três, que comparam o efeito do anticorpo monoclonal Denosumab, com o ácido zoledrónico, nos eventos relacionados com o esqueleto, em doentes com doenças malignas avançadas, relativas a diferentes tipos de tumores que envolvem o osso. Os resultados dos três estudos demonstram uma consistência na prevenção destes eventos (SRE). O Denosumab é uma opção terapêutica potencial para a prevenção de complicações esqueléticas, em pacientes com cancro da próstata, metastático resistente à castração.¹²⁵

Posteriormente, outro estudo foi realizado em pacientes com cancro da próstata metastático, contudo, a eficácia do Denosumab foi comparada com um placebo.¹²⁶

Estudo 3 – “Denosumab And Bone Metastasis-Free Survival In Men With Castration-Resistant Prostate Cancer: Results of a phase 3, Randomized, Placebo-Controlled Trial”

O tratamento com Denosumab prolongou a sobrevivência livre de metástases ósseas, uma vez que a sua mediana foi de 29.5 meses, comparativamente com os 25.2 meses para o placebo, representando uma diminuição do risco de 15%. O Denosumab, também se demonstrou associado ao aumento do tempo até ao aparecimento da primeira metástase óssea, uma vez que o tempo médio para a primeira metástase óssea foi de 33.2 meses, em pacientes recebendo Denosumab e de 29.5 meses para o grupo que recebeu o placebo. Foram ainda verificadas metástases ósseas sintomáticas em 10% dos pacientes tratados com Denosumab e em 13% dos pacientes que receberam o placebo. Com o tratamento de Denosumab, o risco de metástase óssea sintomática diminuiu 33%. Não houve diferenças na sobrevida global entre os dois grupos. A taxa de efeitos adversos graves, foi a mesma tanto para o grupo tratado com Denosumab, como para o grupo placebo, 46%. Em toda a coorte de estudo, não foram identificados quaisquer anticorpos antidenosumab em amostras sanguíneas dos pacientes em estudo.¹²⁶

O tratamento com Denosumab foi novamente associado a uma melhoria da sobrevivência livre de metástases e a uma melhoria do tempo até ao aparecimento da primeira metástase óssea.^{125,126}

Cancro Avançado (Excepto Cancro da Mama e Próstata)

A eficácia do tratamento com Denosumab foi ainda avaliada em pacientes com cancro avançado, exceptuando tanto o cancro da mama como o da próstata, onde foi possível avaliar a evolução da doença, após tratamento de Denosumab ou de ácido zoledrónico.

Estudo 4 – “Randomized, Double-Blind Study of Denosumab Versus Zoledronic Acid The Treatment of Bone Metastasis in Patients With Advanced Cancer (Excluding Breast Cancer and Prostate Cancer) or Multiple Myeloma”

Este estudo apresentou semelhanças com os estudos anteriores, nomeadamente, nas dosagens utilizadas (120 mg de denosumab e 4 mg de ácido zolendróico) a cada quatro semanas, e ainda no parâmetro a analisar, que neste caso se mantém o SRE.¹²⁷

Contrariamente ao que foi demonstrado anteriormente, neste estudo, pacientes que receberam Denosumab não apresentaram um tempo para a primeira SRE superior ao do ácido zolendróico. Também não houve diferenças significativas no tempo para a primeira SRE, nestes dois grupos. Tanto a sobrevivência global, como a progressão da doença, são semelhantes em ambos os grupos. Como seria de esperar, pacientes com um SRE, têm uma maior probabilidade de sofrer SRE subsequentes. A taxa de SRE subsequentes no grupo com Denosumab foi inferior à do grupo com ácido zolendróico, apesar de a nível estatístico não existirem diferenças. Apenas 6,9% dos pacientes que receberam Denosumab, apresentaram reações adversas de fase aguda (pirexia, fadiga e artralgia) nos primeiros três dias, após o início do tratamento, apresentando valores superiores ao dobro, grupo com ácido zolendróico (14,5%). Efeitos adversos renais foram observados em 10,9% dos doentes que receberam ácido zolendróico, enquanto que o grupo com Denosumab foi 8,3%.¹²⁷

Concluindo, pode-se referir que apesar de não existirem diferenças estatísticas, observam-se sempre algumas diferenças entre os grupos. Fazendo a comparação com os estudos anteriores, podemos então afirmar que o tratamento com Denosumab, administrado por via subcutânea a cada quatro semanas, pode ser considerado uma boa opção para o tratamento de doentes com metástases ósseas, apresentando menos efeitos adversos que o tratamento com ácido zolendróico.¹²⁷

Resumidamente, pode dizer-se que estes estudos confirmaram a capacidade do anticorpo monoclonal Denosumab, de reduzir as metástases ósseas em pacientes com cancro da mama e da próstata. Tendo-se verificado um atraso, tanto no surgimento e prevenção de SRE, como no aumento do tempo até ao aparecimento da primeira metástase óssea e ainda a melhoria da sobrevivência livre de metástases (Tabela 2).

Este medicamento, foi então aprovado pela FDA, como terapia adjuvante no cancro da próstata (Prolia[®]) bem como para a prevenção de SREs em pacientes com metástases ósseas provenientes de tumores sólidos (Xgeva[®]).^{128–130}

Tabela 2 – Resultados resumo da eficácia do denosumab comparado com o ácido zoledrónico. Tabela de elaboração própria a partir dos dados de. FDA Approval for Denosumab. *National Cancer Institute*, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-denosumab> (2013)

Resumo dos Resultados do Denosumab na Metastização Óssea		Primeiro SRE em estudo	
		Número de pacientes com SRE (%)	Referências bibliográficas
Estudo 1 Denosumab vs ácido zoledrónico na metastização óssea no Cancro da Mama	Denosumab	30,7	131
	Ácido zoledrónico	36,5	
Estudo 2 Denosumab vs ácido zoledrónico na Metastização óssea no Cancro da Próstata Resistente à Castração	Denosumab	35,9	132
	Ácido zoledrónico	40,6	
Estudo 3 Denosumab na Metastização Óssea em Cancro Avançado (excluindo Cancro da mama e da Próstata)	Denosumab	31,4	133
	Placebo	36,3	

3.1.2. Anticorpo Monoclonal Humanizado – Bevacizumab

O VEGF é extremamente importante para o processo de angiogénese, que por sua vez é importante para o desenvolvimento do cancro. É da responsabilidade da angiogénese a formação de novos capilares, que favorecem a administração de oxigénio e dos nutrientes e que contribuem para a colonização metastática.

Como foi referido anteriormente, o VEGF-A é o principal indutor da angiogénese, estimulando diretamente as células endoteliais capilares, através dos seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2. O primeiro receptor, é responsável por modular a ligação de VEGF ao segundo receptor, que por sua vez irá induzir a resposta endotelial. A expressão do gene VEGF, pode ser aumentada tanto por hipóxia como pela sinalização por oncogenes. O anticorpo monoclonal bevacizumab, liga-se então a este fator de crescimento (VEGF), impedindo a interação/ligação com os seus receptores VEGFR-1 e VEGFR2, presentes na

superfície das células endoteliais. Esta inibição de VEGF vai impedir o desenvolvimento da vasculatura tumoral, impossibilitando a formação de novos vasos e consequentemente, o crescimento tumoral.^{8,134}

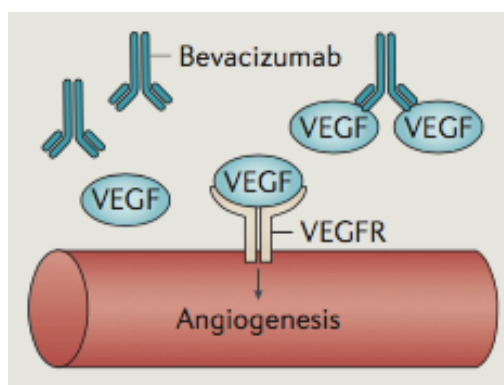


Figura 13 – Modo de atuação de Bevacizumab. **Fonte:** Steeg, P. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–18 (2016).

O anticorpo monoclonal Bevacizumab foi estudado para o tratamento de diversos tipos de cancro, entre eles, o cancro do colorretal metastizado, cancro da mama metastizado, cancro renal metastizado e cancro do colo do útero persistente, recorrente ou metastático. Irão ser apresentados de seguida alguns estudos que levaram à aprovação do Bevacizumab em alguns destes cancros e outros que levaram à revogação para o tratamento de outros tipos de cancro.

Em Fevereiro de 2004, o Bevacizumab foi aprovado pela FDA para o tratamento do cancro do colorretal metastizado. Tendo sido este o primeiro fármaco aprovado para a prevenção da angiogénese. Para além da sua aprovação pela FDA este anticorpo obteve a aprovação pela EMA (*European Medicines Agency*). Esta aprovação só ocorreu após a realização de diversos estudos, que irão ser mencionados de seguida.

Cancro do Colorretal Metastizado

A aprovação do Bevacizumab no tratamento do cancro colorretal metastizado deveu-se à realização de três estudos importantes, que avaliaram a eficácia do tratamento deste anticorpo em pacientes com cancro colorretal metastizado. Um primeiro estudo (*“Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer”*), ocorreu em pacientes que receberam leucovorina (IFL), conjuntamente com placebo IFL, associado a Bevacizumab (5 mg/kg a cada duas semanas), fluorouracilo e leucovorina. Este mostrou-se positivo, uma vez que a média da sobrevida global foi superior no grupo tratado com terapia

combinada de IFL com Bevacizumab (20.3 meses), comparativamente ao IFL com placebo (15.6 meses), tendo o tratamento com Bevacizumab levado a uma redução em 34% do risco de morte. Após tratamento combinado com bevacizumab, a sobrevivência livre de progressão (PFS), foi de 10.6 meses, ou seja, 4.4 meses superior à dos pacientes, tratados com IFN e placebo (6.2 meses).¹³⁵⁻¹³⁷

Apesar do benefício terapêutico do Bevacizumab, verificou-se um aumento de 10% na incidência dos efeitos adversos, de grau três e quatro, como hipertensão, diarreia e leucopenia. Uma vez que o bevacizumab atua inibindo o VEGF, que é necessário para a cicatrização de feridas, o risco de complicações, como feridas dérmicas, pode ser aumentado em pacientes tratados com Bevacizumab. Verificou-se que a associação do Bevacizumab ao IFL foi benéfica no tratamento do cancro colorretal metastizado, uma vez que houve melhorias da sobrevida global bem como da duração da sobrevivência média.¹³⁵⁻¹³⁷

Seguiu-se um outro estudo, semelhante ao anterior em pacientes com carcinoma colorretal metastático que foram tratados com Bevacizumab combinado com FOLFOX4 (*“Bevacizumab Plus FOLFOX4 as Second-Line Treatment of Colorectal Cancer”*). Neste estudo, os pacientes recebiam intravenosamente oxaliplatina e leucovorina simultaneamente e de seguida 5-FU (FOLFOX4). Este processo foi comparado com o grupo de FOLFOX-4 com bevacizumab (BV) e BV em monoterapia. O esquema explicativo da terapia aplicada a três diferentes grupos, encontra-se, de forma mais detalhada na Tabela 3. Os dados demonstraram que o grupo tratado com FOLFOX4 e Bevacizumab, produziu uma duração mais longa da sobrevivência, uma vez que o tempo médio de seguimento dos indivíduos sobreviventes foram de 25 meses para o FOLFOX4 e de 28.9 meses para o FOLFOX4 mais Bevacizumab. A mediana da sobrevida global foi superior em FOLFOX4 com Bevacizumab em 13 meses, comparativamente com os 10.8 meses do grupo apenas com FOLFOX4. Os efeitos adversos que surgiram foram semelhantes ao estudo anterior, mantendo a consistência dos efeitos anteriormente referidos associados ao Bevacizumab. A associação do Bevacizumab à quimioterapia com FOLFOX4 levou a uma melhoria estatística e clinicamente significativa na sobrevida global, comparativamente com o tratamento apenas com quimioterapia com FOLFOX4. Por esta razão, este tratamento foi aprovado, pela FDA, como terapia de segunda linha para o cancro colorrectal metastático.¹³⁸

Tabela 3 – Esquema do protocolo das terapias do ensaio. As terapias foram administradas a cada duas semanas do estudo. Tabela de elaboração própria a partir dos dados do ensaio BV vs FOLFOX4. **Fonte:** Cohen, M. *et al.* FDA drug approval summary: Bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer. *Oncologist* **12**, 356–361 (2007).

Terapia	Oxiplatina	Leucovorina	5-FU	Bevacizumab
FOLFOX4	Perfusão de 85 mg/m² durante 120 minutos (dia 1)	Perfusão de 200 mg/m² durante 120 minutos (dia 1 e 2)	Bolus IV de 400 mg/m² seguido de 600 mg/m² IV durante 22 horas (dia 1 e 2)	-----
FOLFOX4 + bevacizumab	Perfusão de 85 mg/m² durante 120 minutos (dia 1)	Perfusão de 200 mg/m² durante 120 minutos (dia 1 e 2)	Bolus IV de 400 mg/m² seguido de 600 mg/m² IV durante 22 horas (dia 1 e 2)	Perfusão de 10 mg/kg durante 90 minutos (dia 1)
Bevacizumab	-----	-----	-----	Perfusão de 10 mg/kg durante 90 minutos (dia 1)

O Bevacizumab (Avastin® nome comercial do bevacizumab dado pela Genentech) está aprovado (2004) para o tratamento do carcinoma colorrectal metastático de primeira linha, através da combinação com quimioterapia que incluiu leucovorina, 5-fluorouracilo e irinotecano.¹³⁵ O Avastin® também foi aprovado (2006), como tratamento de segunda linha para o mesmo cancro, mas neste caso combinado com quimioterapia do tipo FOLFOX4 (5-fluorouracilo, leucovorina e oxaliplatina).^{138,139}

Em 2013, a FDA e a EMA aprovaram o Avastin® em combinação com quimioterapia fluoropirimidina e irinotecano ou fluoropirimidina e oxaliplatina, para o tratamento de primeira linha do carcinoma colorrectal metastático com Bevacizumab. Esta aprovação foi baseada nos resultados de um terceiro estudo (“Bevacizumab plus chemotherapy as salvage treatment in chemorefractory patients with metastatic colorectal cancer”). Este estudo permitiu avaliar a eficácia do Bevacizumab, no tratamento do cancro colorrectal metastático. O regime de tratamento deste estudo consistia em 5 mg/kg (IV de duas em duas semanas) de Bevacizumab ou 7.5 mg/kg (IV de três em três semanas) em combinação com leucovorina, 5-fluorouracilo e oxaliplatina (FOLFOX) ou leucovorina, 5-fluorouracilo e irinotecano (FOLFIRI) ou capecitabina e oxaliplatina (XELOX).^{139–141}

A mediana da sobrevida global foi de 11.2 meses para o tratamento com o BV enquanto que, na quimioterapia isolada foi de 9.8 meses. A mediana de PFS foi de 5.7 meses no grupo tratado com quimioterapia combinada com BV e de 4.1 meses no grupo apenas com quimioterapia. O seguimento médio no grupo de quimioterapia combinada com Bevacizumab foi de 11.1 meses enquanto no grupo

de quimioterapia isolada foi de 9.6 meses. Assim tanto a OS como a PFS foram superiores no grupo com Bevacizumab. Também se verificou que 98% dos pacientes tratados com Bevacizumab e quimioterapia, e que 99% dos pacientes apenas com quimioterapia tiveram efeitos adversos. Todos os efeitos adversos que apareceram durante o estudo foram comuns e já observados anteriormente.^{139–141}

Este estudo suporta a hipótese de que a inibição de VEGF por parte do Bevacizumab, impede a interação de VEGF com os seus receptores de superfície das células endoteliais, durante o crescimento e metástase tumoral, sendo benéfico em doentes com carcinoma colorrectal metastático.^{139,140}

Tabela 4– Resumo dos Resultados do Tratamento com Bevacizumab aprovado no Cancro colorrectal Metastático. Tabela de elaboração própria a partir dos dados dos diferentes ensaios anteriores (Ensaio 1, 2 e 3).

Resumo dos Resultados do Bevacizumab no Cancro Colorrectal Metastático		PFS (Meses)	ORR* (%)	Ano da aprovação pela FDA	Referências bibliográficas
Estudo 1 Bevacizumab com Irinotecano, Fluoruracilo e IFL vs IFL e Placebo (primeira linha no cancro colorrectal metastático)	IFL + Bevacizumab	10.6	44,8	2004	135
	IFL + Placebo	6.2	34,8		
Estudo 2 Bevacizumab com FOLFOX4 (Segunda Linha no cancro colorrectal metastático)	FOLFOX4 + Bevacizumab	7.5	22,2	2006	138
	FOLFOX4	4.5	8,6		
Estudo 3 Bevacizumab com FOLFOX e FOLFIRI (cancro colorrectal metastático que progrediu)			OS (meses)		
	BV + Quimioterapia	5.7	11,2	2013	139–141
	Quimioterapia isolada	4.1	9,8		

*ORR – Taxa de Resposta Objetiva

Cancro da Mama Metastizado

Em Fevereiro de 2008, o Bevacizumab foi aprovado para o tratamento do cancro da mama metastizado, de acordo com o programa de aprovação acelerada da FDA. Este programa possibilita um acesso rápido dos medicamentos inovadores para condições graves, sendo aprovados, com base em dados que não são suficientemente completos para permitir a sua aprovação total. Esta aprovação acelerada, baseou-se num estudo comparativo da eficácia da combinação de Bevacizumab e paclitaxel, com paclitaxel em monoterapia no tratamento de doentes com cancro da mama metastizado.¹³⁹

A eficácia e a segurança do bevacizumab neste tratamento de primeira linha foi avaliada, com base em diversos estudos. Assim, num primeiro estudo ocorreu uma comparação entre o tratamento com Bevacizumab associado a paclitaxel com o paclitaxel em monoterapia. Esta combinação de paclitaxel com Bevacizumab prolongou a PFS, comparativamente com a monoterapia com paclitaxel (11.8 meses vs 5.9 meses), não se tendo verificado melhoria na sobrevida global. A tendência manteve-se na ORR (Taxa de resposta objetiva), tendo sido também superior na terapia combinada (36,9%) comparada com a monoterapia (21,2%). Surgiram efeitos adversos tais como proteinúria e hipertensão, mas apenas no grupo com Bevacizumab, sendo estes efeitos adversos inerentes ao próprio tratamento com o anticorpo monoclonal.^{139,142,143}

Num segundo estudo foi avaliada novamente a eficácia e a segurança do tratamento com Bevacizumab, em doentes com carcinoma da mama metastático apenas como segunda e terceira linha. Neste caso, salienta-se que a população em estudo recebeu previamente antraciclina e taxano, pelo que foram randomizados para receber capecitabina combinada com Bevacizumab ou capecitabina em monoterapia. Relativamente a este estudo não se conseguiu demonstrar uma melhoria significativa na PFS ou na sobrevivência global.^{139,144,145}

Quanto ao último estudo analisado, podemos referir que recolheu apenas dados dos seus efeitos adversos onde se demonstrou um aumento de 20% no grupo de terapia combinada (Bevacizumab e paclitaxel), comparativamente à monoterapia. Os efeitos adversos mais comuns, no grupo tratado com Bevacizumab em terapia combinada, foram neuropatia sensorial, hipertensão, fadiga, infeções sem neutropenia, neutropenia, vômitos, diarreia, dor óssea, cefaleia, proteinúria e isquemia cerebrovascular. Verificou-se que 1,7% dos efeitos adversos, na população em estudo, acabaram por ser fatais.

Desta forma, em 2011 a FDA revogou a utilização de bevacizumab para o cancro da mama metastizado, uma vez que, após os três estudos mencionados anteriormente, os resultados não foram coerentes, não demonstrando o seu benefício ao nível do atraso do crescimento do tumor, que poderia justificar o risco dos efeitos adversos graves e potencialmente fatais. Por esta razão o Avastin® deixou de ser utilizado para o tratamento do cancro da mama metastizado.

Carcinoma Renal Metastizado

A aprovação do Bevacizumab, no tratamento do cancro renal metastizado, baseou-se em vários estudos importantes, que avaliaram a eficácia do tratamento deste anticorpo em pacientes com cancro renal metastizado. Um primeiro estudo, desenvolvido por James Yang em 2003 (“A Randomized Trial of Bevacizumab, an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody, for Metastatic Renal Cancer”), comparou o tratamento com Bevacizumab em diferentes dosagens, 3mg/kg e 10 mg/kg, a cada duas semanas. Com estes estudo verificou-se que o grupo que recebeu Bevacizumab a 10 mg/kg apresentou uma PFS mais longa (4.8 meses) do que a verificada no grupo de placebo (2.5 meses). Relativamente à dose mais baixa de Bevacizumab, quando comparada com o grupo placebo, não se verificaram diferenças significativas. O grupo sujeito a uma dose superior de bevacizumab apresentou então uma PFS de 64%, comparativamente aos 39% do grupo sujeito a uma dose inferior e a 20%, no grupo placebo. Relativamente à sobrevida global da doença não foram verificadas diferenças entre os grupos. Este acontecimento, serviu de base para o desenvolvimento de novos estudos mais aprofundados, demonstrativas das vantagens claras da utilização deste anticorpo na doença metastática.¹⁴⁶

A combinação de Bevacizumab com interferão α -2a, foi aprovado pela FDA em 2009, para o tratamento do carcinoma metastático das células renais. Esta aprovação baseou-se nos resultados de dois ensaios.

O ensaio principal, duplamente-cego randomizado de fase III, tinha como objetivo a avaliação da eficácia e segurança do Bevacizumab, combinado com interferão α -2a (Referon), comparando-o com interferão α -2a associado ao placebo. O ensaio de suporte utilizava a combinação de bevacizumab com interferão α -2b (Intron) comparativamente a este isolado. Este estudo, contrariamente ao principal, não era cego. Um terceiro estudo foi realizado, de forma a avaliar também a eficácia

e a segurança do Bevacizumab combinado, mas neste caso, com cloridrato de erlotinib (Tarceva) possibilitando a sua comparação com o bevacizumab isolado.¹⁴⁷

O ensaio fundamental (*“Bevacizumab Plus Interferon Alfa-2a For Treatment Of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Randomised, Double-Blind Phase III Trial”*) realizado em 2009, avaliou a eficácia do tratamento com Bevacizumab combinado com interferão α no tratamento de pacientes com carcinoma de células renais (CCR) metastático não tratados anteriormente.^{131,147}

Verificou-se que a associação de interferão α -2a com Bevacizumab, melhorou significativamente a sobrevida livre de progressão, sendo a mediana, substancialmente mais longa no grupo tratado com interferão α -2a e Bevacizumab (10,2 meses) comparativamente à sobrevida livre de progressão no grupo placebo que foi de apenas 5.4 meses. Também foi visível a melhoria da taxa de resposta global, tendo o grupo tratado com Bevacizumab mais interferão α -2a apresentado uma taxa de resposta global de 31% enquanto que, o grupo placebo foi de apenas 13%. Em 70% dos pacientes tratados com Bevacizumab demonstraram retração tumoral, comparativamente a 39% do grupo com placebo.

Os dados de segurança, são consistentes com o observado anteriormente em doentes cancerosos tratados com Bevacizumab, tendo surgido efeitos adversos em 97% dos pacientes tratados com Bevacizumab e em 94% dos sujeitos a placebo.¹³¹

Um outro estudo de suporte, importante na aprovação do Bevacizumab no tratamento de CCR metastático, comparou o tratamento com Bevacizumab combinado com interferão α -2b e interferão α -2b em monoterapia. (*“Bevacizumab Plus Interferon Alfa Compared With Interferon Alfa Monotherapy in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: CALGB 90206”*).¹³²

Neste estudo, foi visível que a associação de Bevacizumab com interferão prolongou novamente a sobrevida livre de progressão, apresentando uma mediana de 9.7 meses no grupo com terapia combinada, comparado com 5,2 meses nos pacientes em monoterapia. A ORR manteve esta tendência, apresentando-se também superior no grupo tratado com a combinação de Bevacizumab e interferão (25,5%), do que no grupo tratado apenas com interferão (13,1%). A duração média de resposta foi de 8.7 meses para monoterapia comparativamente com os 11.9 na terapia combinada.¹³² Foi possível novamente, verificar que os doentes tratados com este anticorpo apresentaram efeitos secundários tais como a hipertensão e a proteinúria, mantendo uma consistência no que foi verificado anteriormente, onde estes efeitos adversos estão associados ao tratamento com Bevacizumab.¹³²

O terceiro e último estudo comparou o Bevacizumab e everolimus no tratamento do mesmo carcinoma (RCC). (*“A Phase II Study of Bevacizumab and Everolimus as*

Treatment for Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma”).¹⁴⁸ A população em estudo recebeu intravenosamente Bevacizumab a 10mg/kg a cada 14 dias e everolimus administrado oralmente todos os dias. Todos os pacientes em estudo tinham recebido anteriormente um inibidor de VEGF, 70% o sunitinib ou 30% o sorafenib.¹³³ A combinação de Bevacizumab com everolimus neste estudo foi tóxica e desta forma, a eficácia alcançada não suportou o efeito combinado.¹⁴⁸

O Bevacizumab combinado com interferão α foi aprovado como primeira linha no tratamento do carcinoma das células renais metastizado, após ter demonstrado taxas medianas de sobrevida livre de progressão entre 8.5 a 10.2 meses e respostas objetivas de 26% a 31%.

Apesar de anteriormente se ter feito referência a um estudo com o Bevacizumab em monoterapia no tratamento do cancro renal metastizado, verificaram-se novos dados sobre o efeito deste anticorpo em monoterapia. Estes dados foram recentemente (2015) reportados num estudo randomizado de fase dois, onde os pacientes foram sujeitos a diferentes terapias: Bevacizumab em monoterapia em diferentes dosagens e combinado com diferentes inibidores mTOR.¹⁴⁹ Os pacientes sujeitos a Bevacizumab em monoterapia, apresentaram uma sobrevivência livre de progressão superior (7.5 meses) à verificada por James Yang, em 2003 (4.8 meses). Contudo, ficou demonstrado que os regimes de combinação são benéficos uma vez que apresentaram uma eficácia coerente, tendo-se verificado que este grupo foi o que obteve uma resposta mais longa e com uma maior taxa de resposta. Apesar dos resultados em termos de eficácia terem sido positivos, há uma certa dificuldade em combinar estes agentes, devido à sua taxa elevada de toxicidade. A toxicidade de inibidores de VEGF e de inibidores do receptor VEGFR ainda não é bem conhecida. Algumas investigações demonstraram que a resistência ao receptor de VEGF é, em certa parte, resultado da produção de fatores de crescimento endoteliais alternativos, capazes de restaurar a angiogénese, apesar do receptor permanecer bloqueado.¹⁴⁹

Um estudo realizado em paralelo com este comparava a associação de Bevacizumab e temsirolimus com bevacizumab e interferão. Chegou à conclusão que apesar das diferenças não serem muito grandes, o grupo tratado com Bevacizumab e interferão apresentou uma PFS superior com 9.3 meses, comparativamente aos 9.1 meses, no grupo com temsirolimus. O mesmo aconteceu para a ORR que foi de 27%, para pacientes que receberam Bevacizumab e temsirolimus e de 27,4% para os que receberam o anticorpo e o interferão. Os efeitos adversos foram consistentes com os conhecidos para os três compostos em

estudo. Os efeitos adversos mais comuns foram, a proteinúria e a hipertensão, que estão ambos associados ao tratamento com Bevacizumab, mantendo a consistência dos efeitos adversos nos estudos anteriores do tratamento com Bevacizumab.¹⁵⁰

Como conclusão, podemos referir que o interferão combinado com Bevacizumab é a terapêutica de primeira linha aprovada pela FDA para doentes com mRCC, uma vez que os dados de segurança foram consistentes entre os diversos estudos.

Tabela 3 – Resultados resumo da eficácia (sobrevivência livre de progressão) do bevacizumab nos diferentes estudos indicados que levaram à aprovação pela FDA do bevacizumab em RCC. Tabela de elaboração própria a partir dos dados dos diferentes estudos.

Resumo dos Resultados do Bevacizumab no Cancro das Células Renais Metastizado		PFS (meses)	Referências bibliográficas
Estudo Fundamental Bevacizumab com Interferão α -2a em CCR	Bevacizumab + Interferão α -2a	10.2	131
	Placebo	5.4	
Estudo de Suporte Bevacizumab com Interferão α -2a vs Interferão α -2a sozinho em CCR	Bevacizumab + Interferão α -2a	10.2	132
	Interferão α -2a	5.4	
Ensaio 3 Bevacizumab com Everolimus em RCC Interferão α -2a em CCR	Bevacizumab com Everolimus	5.1	133

Cancro Colo do Útero Persistente, Recorrente ou Metastático

Em 2014, a FDA aprovou um novo uso do Avastin®, que consiste na sua utilização em combinação com paclitaxel e cisplatina ou topotecano, para o tratamento do cancro cervical persistente, recorrente ou metastático. A sua aprovação baseou-se nos resultados de um ensaio randomizado com quatro grupos. A primeira comparação foi feita entre o grupo com Bevacizumab (15 mg/kg IV a cada 3 semanas) mais quimioterapia e quimioterapia isolada (paclitaxel e cisplatina ou paclitaxel e topotecano). A segunda comparação ocorreu entre o grupo tratado com paclitaxel mais cisplatina e com paclitaxel e topotecano, independentemente da junção do anticorpo monoclonal.^{139,151}

Na primeira comparação, o ensaio demonstrou que houve uma melhoria estatisticamente significativa, no grupo tratado com Bevacizumab combinado com quimioterapia, comparativamente com os doentes que apenas receberam quimioterapia. A mediana da sobrevida foi superior nos pacientes tratados com BV e quimioterapia (16.8 meses) comparativamente com os pacientes com quimioterapia isolada (12.9 meses). O risco associado à adição de Bevacizumab, a qualquer um dos regimes foi semelhante. Não houve uma melhoria na sobrevivência global nos grupos tratados com Bevacizumab e nos que foram tratados com paclitaxel mais cisplatina. Paclitaxel com topotecano e Bevacizumab, é então o regime aceitável para o tratamento de pacientes com cancro cervical, que não podem ser sujeitas a tratamento de platina.^{139,151}

O Avastin®, para além de ter sido aprovado para o tratamento do carcinoma das células renais metastático, do cancro colorrectal metastático e do cancro colo do útero persistente, recorrente ou metastático, também foi aprovado para terapias oncológicas não específicas da doença metastática, nomeadamente, no tratamento de primeira linha do cancro das células não pequenas do pulmão, de segunda linha no glioblastoma e ainda no cancro dos ovários, trompas de falópio ou peritoneal primário resistente à platina.¹³⁹

3.1.3. Crizotinib

Como se verificou anteriormente, a causa de muitos tumores devem-se a mutações em determinados genes. Uma destas situações é a do cancro das células não pequenas do pulmão (NSCLC). O oncogene ROS-1 codifica o receptor ALK (Receptor tirosina cinase do linfoma anaplásico), sendo que este coordena uma proteína da família de RTKs. Estas são vias de sinalização importantes em diversos processos celulares, tais como a proliferação e a divisão celular. Entre 3 a 5% das pessoas com NSCLC apresentam mutações neste gene. Sendo ROS-1 um gene semelhante a ALK, uma mutação em ROS-1 irá também desencadear um crescimento tumoral e a sobrevivência do mesmo, neste caso entre 1 a 2% das pessoas com NSCLC apresentam esta mutação.¹⁵²⁻¹⁵⁴

O Crizotinib liga-se com elevada afinidade às proteínas ALK e ROS-1, inibindo potentemente a sinalização de ROS-1 impedindo a proliferação, migração e invasão celular.¹⁵⁵

Em Março de 2016, a FDA aprovou o crizotinib (Xalkori®) para o tratamento do cancro avançado metastático das células não pequenas do pulmão nos tumores, que apresentam alterações no gene ROS-1. Esta aprovação baseou-se nos

resultados de um ensaio clínico que envolveu 50 doentes com NSCLC metastático com mutação em ROS-1, tendo sido sujeitos a uma dose oral de 250 mg de Crizotinib duas vezes por dia. Para além da FDA, este anticorpo obteve ainda a aprovação pela agência europeia do medicamento.¹⁵⁶

A taxa de resposta objetiva foi de 72%, onde 6% dos pacientes, tiveram uma resposta completa, 66% tiveram respostas parciais e 18% apresentaram a estabilização da doença como a melhor resposta. A duração média da resposta foi de 17.6 meses e a média da PFS foi de 19.2 meses. Sendo que 50% dos pacientes ainda se encontravam em seguimento para a progressão. Pelo menos em 10% dos pacientes surgiram efeitos adversos, onde a deficiência visual, a diarreia, as náuseas, o edema periférico, a obstipação, os vômitos, a fadiga disgeusia e as tonturas, foram os mais comuns. Este estudo conseguiu demonstrar a potente atividade anti-tumoral do Crizotinib em pacientes com NSCLC avançado (metastático) com rearranjo em ROS-1.¹⁵⁶

3.1.4. Ipilimumab

O sistema imunitário desempenha um papel determinante no combate ao cancro, contudo, foi referido anteriormente que o TME apresenta células imunitárias que podem ser utilizadas pelas das células cancerosas para o seu proveito.

A resposta primária do sistema imunitário, após contacto com o tumor, é a ligação da proteína do complexo major de histocompatibilidade (MHC) ao receptor da célula T. A CTLA4 (antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos) compete com CD28 para se ligar ao receptor B7 na célula apresentadora de antígeno, atenuando as respostas das células T. O Ipilimumab bloqueia o CTLA-4 potenciando as respostas das células T, prolongando a sua atividade e facilitando o trabalho do sistema imunitário no combate à doença metastática.^{157,158}

Em 2011, a FDA aprovou o anticorpo monoclonal Ipilimumab (Yervoy®), para o tratamento de melanoma não-ressecável ou metastático.¹⁵⁹ Esta aprovação baseou-se num estudo de fase III randomizado, em doentes com génotipo positivo HLA-A2*0201 (vacina de tumor), que receberam pelo menos um tratamento sistémico prévio para o melanoma. Este anticorpo também se encontra aprovado a nível europeu através da EMA.

Os doentes foram distribuídos aleatoriamente em grupos, uns receberam 3 mg/kg de ipilimumab via IV em combinação com a vacina do tumor, outros,

Ipilimumab mais placebo e por último, um grupo recebeu a vacina de tumor com placebo.

A taxa de OS foi superior, nos doentes tratados apenas com Ipilimumab (10,9%), comparativamente com os doentes que receberam Ipilimumab com vacina do tumor (5,7%). Os que apenas foram tratados com vacina, apresentaram uma taxa de OS de apenas 1,5%. Verificou-se que os pacientes tratados com Ipilimumab e placebo apresentaram uma OS mediana de 10 meses, enquanto que os pacientes tratados com o vacina do tumor e placebo apresentaram apenas 6 meses. Os efeitos adversos mais comuns após este estudo, foram manifestações derivadas do sistema imunitário, tais como a diarreia, o prurido, a erupção cutânea e a colite. Concluindo, pode referir-se que o Ipilimumab é uma boa opção terapêutica no tratamento do melanoma metastático, uma vez que demonstrou uma sobrevivência global favorável.^{159,160}

3.1.5. Pembrolizumab

Da mesma forma que ipilimumab desempenha um papel importante no tratamento anti-metastização, associado ao sistema imunitário, o pembrolizumab também é uma boa opção para o tratamento da doença metastática. Mas neste caso o pembrolizumab é um inibidor de PD-1. O PD-1 encontra-se nas células T ativadas, nas células B e nas células mieloides. Certos tumores apresentam uma elevada expressão do ligando de PD1 (PDL1). A interação PD1-PDL1 permite ao tumor a supressão do controle imunitário.^{161,162}

Em 2016, a FDA aprovou o anticorpo monoclonal pembrolizumab (Keytruda®) para o tratamento do cancro metastático das células não pequenas do pulmão. Esta aprovação baseou-se em dois estudos randomizados. Um dos ensaios foi realizado em doentes com NSCLC metastático, que não tinham sido sujeitos a tratamento prévio para a doença. Os doentes que receberam 200 mg de Pembrolizumab a cada 3 semanas, apresentavam uma melhoria na PFS, com uma mediana de 10.3 meses comparativamente com os 6 meses, dos que receberam quimioterapia com compostos de platina. Desta forma, foi demonstrada a mais valia do tratamento com Pembrolizumab nos pacientes com NSCLC. O segundo estudo, com uma amostra de doentes superior, comparou-se o tratamento com 2 mg/kg de Pembrolizumab a cada 3 semanas, com 10 mg/kg de Pembrolizumab a cada 3 semanas e ainda, com o grupo tratado com docetaxel. Foi visível uma melhoria de OS nos grupos com Pembrolizumab, tanto a 3 mg/kg como a 10 mg/kg. A

sobrevivência média foi superior no grupo tratado com a dose maior de pembrolizumab com uma sobrevivência média de 12.7 meses, enquanto que o grupo que recebeu uma menor dose de pembrolizumab apresentou uma sobrevivência média de 10.4 meses, já o grupo sujeito a quimioterapia com docetaxel obteve uma sobrevivência média de 8.5 meses. Os efeitos adversos mais comuns, foram a diminuição do apetite, a fadiga, as náuseas, a dispneia, a tosse e a obstipação. Contudo, surgiram ainda alguns efeitos adversos raros, mais graves, como a pneumonite imunomediada, a colite, a hepatite, aendocrinopatias e a nefrite.^{162,163}

Concluindo, a utilização de pembrolizumab é favorável no tratamento de NSCLC metastático, tendo sido visíveis as melhorias neste campo.

3.1.6. Cilengitide

Anteriormente vimos a importância da interrupção da interação RANK-RANKL e a inibição do VEGF, para o tratamento da doença metastática. Para além do VEGF, as integrinas também têm um papel importante no processo de angiogénese, sendo estas moléculas de adesão à superfície celular. Estas moléculas de adesão são essenciais para o processo de proliferação celular e angiogénese tumoral, encontrando-se expressas nas células cancerosas. As células endoteliais quando ativadas por citocinas secretadas pelo tumor, expressam as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$. Por sua vez, estas ligam-se a componentes da matriz celular como a vitronectina, as fibronectinas, os produtos de degradação da matriz e as trombospondinas. Antagonistas destas integrinas conseguem ativar a apoptose das células tumorais evitando a proliferação das mesmas.^{8,164,165}

Chegou-se à conclusão que as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ seriam um alvo terapêutico e por esta razão surgiu o cilengitide, um inibidor peptídico cíclico das mesmas, como candidato à terapêutica anti-metastização. O cilengitide tem uma grande especificidade para as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ ligando-se às mesmas, inibindo a ligação das integrinas à vitronectina, promovendo a morte celular (Figura 14).^{8,164,166}

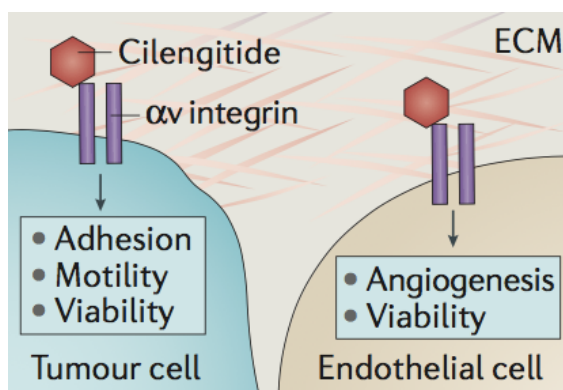


Figura 14 – Modo de atuação de Cilengitide. **Fonte:** Steeg, P. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–18 (2016).

Melanoma Metastizado

Estudo 1 - A randomized phase II study of cilengitide (EMD 121974) in patients with metastatic melanoma

Um estudo de fase II permitiu avaliar a eficácia do cilengitide no tratamento do melanoma metastático. Os pacientes em estudo foram randomizados em grupos tratados com 500 mg de cilengitide ou com 2000 mg, por infusão IV duas vezes por semana. Apenas três pacientes (um paciente no grupo tratado com 2000mg de cilengitide e dois pacientes do grupo com 500 mg do mesmo), permaneceram livres da progressão da doença às 8 semanas, tendo apresentado PFS de 10.5 (2000mg cilengitide), 5.5, e 3.9 meses (500mg cilengitide).

A taxa de PFS às 8 semanas foi de 12%, no grupo que recebeu uma dose inferior de cilengitide e de 14% no grupo que recebeu a dose maior do mesmo. A sobrevivência global foi de 9.6 meses em seis pacientes que após mais quatro anos ainda estão vivos. Relativamente à segurança de cilengitide, verificou-se que este é bem tolerado, uma vez que os efeitos adversos que surgiram não são significativos, tendo surgido mais frequentemente efeitos como obstipação, fadiga, anemia, artralgia e neuropatia periférica.¹⁶⁴

Este estudo demonstrou que a dose de 2000 mg de cilengitide, é bem tolerada mas apresenta uma eficácia clínica mínima. Apenas 42% dos pacientes apresentavam a integrina $\alpha_v\beta_3$ expressa nos tumores em estudo. Dado que teoricamente 80 a 90% dos melanomas, expressam esta integrina, este dado constitui um bom indicador. Contudo, apesar haver de uma diminuição da expressão desta integrina, não são visíveis diferenças significativas, na eficácia do tratamento

da doença metastática e assim, ainda persistem justificações do porquê da sua falta de eficácia clínica.¹⁶⁴

Glioblastoma

Estudo 2 - Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter: a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial

Posteriormente, analisou-se a eficácia do tratamento com cilengitide combinado, em pacientes recentemente diagnosticados com glioblastoma, com o promotor MGMT metilado. A MGMT é uma proteína importante no processo de reparação do DNA sendo um importante fator no prognóstico do glioblastoma.

Assim, este ensaio de fase III permitiu avaliar novamente a eficácia da cilengitide com a proteína MGMT metilada. Os pacientes foram randomizados para receber quimioterapia temozolomida com 2000 mg de cilengitide (IV duas vezes por semana) ou para receberem apenas temozolomida.

A mediana da sobrevivência global foi de 26.3 meses em ambos os grupos. A sobrevivência a dois anos, não diferiu entre os grupos, mantendo-se consistente com estudos anteriores em pacientes com MGMT metilado. A PFS mediana foi de 13.5 meses, no grupo que recebeu cilengitide e 10.7 meses no grupo apenas com quimioterapia. A adição de cilengitide ao tratamento do glioblastoma com MGMT metilado, não desencadeou efeitos adversos aumentados.¹⁶⁷

O tratamento com cilengitide combinado com temozolomida, não apresentou melhoria nos seus resultados, nem na sobrevida global nem na progressão livre de doença nos subgrupos em estudo. Contudo, este fármaco mostrou-se seguro e bem tolerado quando combinado com a quimioterapia em causa. A atividade de cilengitide nos estudos de fase I e II (estudo 1) não se verificou neste estudo de fase III. Os resultados dos ensaios clínicos foram negativos e por esta razão não foi aprovado pela FDA para a doença metastática.^{164,167,168}

3.1.7. Desatinib e Saracatenib

Uma família de proteínas cinases importante é a Src (SFKs) podendo ser c-Src (Pro Proto-oncogene da tirosina cinase Src), Lyn entre outras. As SFKs têm um papel importante na adesão celular, invasão, proliferação, sobrevivência e

angiogénese durante o desenvolvimento tumoral, sendo os seus níveis de expressão variáveis entre tecidos. O C-Src encontra-se sobreexpresso durante a progressão tumoral, estando presente em tumores humanos tais como o do pulmão, a da mama, o do pancreático, o do cólon e o da próstata. As SFKs podem interagir com diversos receptores de tirosina cinase, entre eles EGFR e VEGFR. Quanto ao EGFR pode-se ligar a c-Src fosforilando os locais de tirosina quinase. A sobreexpressão de c-Src pode aumentar a síntese de DNA induzida por EGF nas células cancerosas. Algo semelhante acontece com o VEGF, uma vez que as SFKs conseguem aumentar a regulação da expressão do gene VEGF, aumentando a atividade deste fator angiogénico desencadeando a progressão e proliferação tumoral. Assim, o aumento de SFKs, nomeadamente de c-Src, está associado a certas neoplasias, incluindo metastização das mesmas. Desta forma, um potencial alvo terapêutico para a doença metastática será então a repressão de c-Src, diminuindo a atividade de VEGF, a vasculatura tumoral, a progressão e a metastização da doença. O c-Src quando ativado, forma um complexo com a cinase de adesão focal (FAK), promovendo a formação de adesões focais ^{8,169,170}

O Desatinib inibe especificamente o Src e a proteína de fusão BCR-ABL subjacente à leucemia mieloide crónica (CML). Saracatinib é também um inibidor dos mesmos alvos. Estes bloqueiam especificamente oSrc e suprime a adesão, migração e invasão das células cancerosas. O objetivo da implementação destes fármacos será diminuir o tamanho do tumor mas principalmente das metástases através do bloqueio de Src (Figura 15). O desatinib, com o nome comercial de Sprycel®, foi aprovado pela FDA para o tratamento de fase crónica de CML com cromossoma Filadélfia positivo, bem como para o tratamento de fase crónica de CML, com resistência ou intolerância à terapia primária e para ambos quando associados. Contudo, a eficácia clínica do desatinib contra a doença metastática, não tem sido como seria de esperar. O saracatinib foi descontinuado pelo fabricante, uma vez que através de um estudo de fase II realizado em pacientes com cancro da mama metastizado sujeitos a tratamento com saracatinib, se verificou que este fármaco não tem atividade suficiente para tratar estes pacientes com a doença metastática. ^{8,170–173}

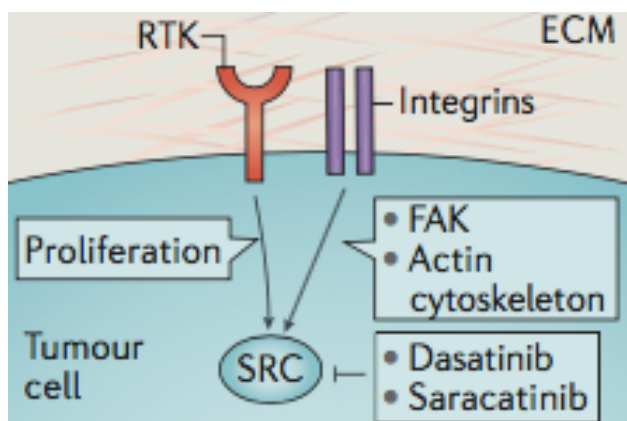


Figura 15 – Modo de atuação do Dasatinib e Saracatinib. **Fonte:** Steeg, P. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–18 (2016).

3.2. Investigação

Anteriormente, vimos alguns dos fármacos que se encontram em prática clínica, após serem aprovados tanto pela EMA como pela FDA, para o tratamento da doença metastática. Contudo, apesar de estes terem demonstrado alguma eficácia há sempre forma de melhorar os resultados, de forma a tratar cada vez mais especificamente esta doença e conseguir-se um perfil de segurança e de tolerabilidade cada vez superior.

No capítulo da metastização falou-se das diversas etapas deste processo, sendo que todo este processo representa um potencial alvo terapêutico.

3.2.1. Implantação (seeding)

A etapa inicial da metastização, *seeding*, envolve a invasão primária das células tumorais do tumor primário, passagem pela circulação e extravasamento. Contudo, na maioria dos doentes esta etapa já foi ultrapassada na altura do diagnóstico e desta forma, a intervenção terapêutica torna-se impossível.⁸ Estudos comparativos dos perfis de mutações de tumores primários e as lesões metastáticas associadas, demonstraram a associação da presença de mutações com o aparecimento de metástases. Desta forma, um contributo para a investigação de novos alvos terapêuticos baseia-se em estudos de sequenciação de DNA. Contudo são necessários ensaios pré-clínicos que suportem esta evidência.^{8,174–176}

3.2.2. Fase de dormência

A fase de dormência dá seguimento ao processo de metastização, onde em cancros como o da mama e da próstata, o processo de colonização metastática, ocorre de forma retardada. Ou seja, as células tumorais disseminam-se mas não originam metástases evidentes, permanecendo latentes no possível local onde irá ocorrer mais tarde a metastização. Estas células tumorais ficam habitualmente dormentes na medula óssea, até que irão eventualmente ser ativadas para formar as metástases.

3.2.2.1. Especifico de interrupção do crescimento 6 (*Growth arrest specific 6*) - GAS6

Trabalhos realizados por Russell Taichman e os seus colaboradores, em linhas celulares de cancro da próstata (PCa), demonstraram que a quiescência das células estaminais hematopoéticas (HSCs) na medula, é regulada por um microambiente composto predominantemente por osteoblastos, células endoteliais e outros elementos da medula óssea. Os osteoblastos secretam GAS6 (Especifico de interrupção do crescimento 6 (*Growth arrest specific 6*)) que tem a capacidade de regular a quiescência de HSC. O GAS6 liga-se a receptores de tirosina quinase Axl, Tyro3 e Mer e em certos casos inibe a proliferação, enquanto que noutros promove a sobrevivência, aumenta a resistência à quimioterapia e estimula a proliferação. O equilíbrio entre a expressão de Axl e Tyro3 indica se os HSCs permanecem quiescentes ou se proliferam. Quando às células PCa que se ligam aos osteoblastos, aumentam a expressão de Axl e consequentemente a sinalização GAS6, que inibe a proliferação das células PCa. Assim, a partir do momento em que as células PCa disseminadas entram na medula, as interações entre GAS6 e os receptores podem regular o estado de quiescência e a proliferação das mesmas. Com este estudo, chegou-se à conclusão que quando os níveis de Axl são superiores a Tyro3, as células disseminadas encontram-se na sua maioria, quiescentes. Contrariamente, quando a expressão de Tyro3 é superior estas células proliferam com maior frequência.¹⁷⁷

3.2.2.2. Detecção de células dormentes

Em 2015, Michelle Lawson e a sua equipa, conseguiram demonstrar a capacidade de detecção das células dormentes do mieloma. Estas células são resistentes à quimioterapia, uma vez que esta terapêutica apenas atua em células em divisão. Encontrando-se estas em dormência e não em divisão, torna-se impossível a sua eliminação por esta via. Neste estudo, conseguiu-se desenvolver uma técnica de rastreamento das células de mieloma individualmente, por imagem intravital, conseguindo detetar-se as células em dormência e desta forma, fornecer a base para o desenvolvimento de novas abordagens para a prevenção da progressão da doença.¹⁷⁸

3.2.3. Colonização Metastática

A etapa seguinte, a colonização metastática, continua a ser a etapa mais analisada para o desenvolvimento terapêutico de fármacos anti-metastização e para a prevenção de lesões adicionais. A colonização metastática engloba todos os processos que permitem o crescimento de metástases, num local externo ao tumor primário. Sabe-se que, como já foi mencionado anteriormente diversas vezes, os tumores apresentam mutações oncogénicas, que permitem a sua evolução. As mutações mais comuns são por exemplo a TP53, tal como já se falou detalhadamente, KRAS, ESR1 (Receptor de Estrogénio 1), MYC e BRAF. Muitas das vias afetadas, por estas mutações demonstram afectar a capacidade metastática.⁸

3.2.3.1. Mutações TP53 e Plasticidade Transcricional

Em 2015, uma equipa de investigadores orientada por Eva Lenfert, analisou o envolvimento das mutações TP53 no desenvolvimento de metástases em ratinhos com tumores mamários. Neste estudo, foram explorados os efeitos da expressão de mutações em p53 em ratinhos monotransgénicos e bitransgénicos, com tumores mamários fenotipicamente semelhantes que possuíam assinatura genética de transição epitelial-mesenquimal (EMT), associada à plasticidade de células tumorais. Anteriormente, foi demonstrado o envolvimento de mutações no p53 na indução de EMT.^{179,180} Verificou-se um agravamento do fenótipo tumoral nos ratinhos

bitransgénicos, onde a co-expressão da mutação em p53 agravou o fenótipo de carcinomas mamários ao nível de grau tumoral e potencial metastático.¹⁸¹

Esta equipa descreveu a capacidade da mutação em p53 atuar como regulador transcricional global. Contudo, os mecanismos pelos quais esta mutação induz o gene EMT ainda se encontram sob investigação.¹⁸¹

De acordo com os dados deste estudo, e tal como foi proposto por Ding et. al¹⁸², o fenótipo das células tumorais é controlado pela interação destas células com o microambiente tumoral. Células que exibem EMT podem apresentar uma maior probabilidade de escapar a tais controlos do microambiente, permitindo às células cancerosas disseminar e consequentemente metastizar.¹⁸¹

De acordo com o papel dos componentes do microambiente tumoral e a sua importância no processo de colonização metastática, estes podem ser possíveis alvos terapêuticos no combate à metastização.⁸

3.2.3.2. Supressão da Metastização por CXCL16 (*Quimiocina (C-X-C motif) ligando 16*)

As quimiocinas estão presentes no TME e têm um papel importante na regulação da migração das células imunitárias em inflamação e homeostase através, por exemplo, da interação com os receptores acoplados à proteína G. Certas quimiocinas contribuem para a colonização metastática, promovendo a infiltração e a sobrevivência de macrófagos.

Um estudo realizado num modelo murino, avaliou a supressão da metastização através da quimiocina CXCL16, em células de cancro colorrectal. Esta quimiocina promove a infiltração tumoral de células *natural-killer*. A CXCL16 é uma quimiocina transmembranar que induz a expressão do seu receptor CXCR6. CXCL16 encontra-se expressa em macrófagos, células dendríticas, monócitos e células B, enquanto que as células T CD8 ativadas, CD4 e NKT expressam o receptor. Células cancerosas foram injetadas e verificou-se que aquelas que expressavam CXCL16, tinham a capacidade de inibir as metástases no fígado, uma vez que esta induz o recrutamento de elementos do sistema imunitário. Foi ainda visível um aumento das células onde CXCR6 era expresso no tecido metastático que expressa CXCL16. Assim, foi demonstrado o efeito inibitório de CXCL16 sobre as metástases hepáticas em células com cancro colorrectal.¹⁸³

3.2.3.3. Inibição de CCL2 Suprime a Metastização

Outro estudo pré-clínico analisou, não o aumento dos níveis de uma quimiocina na diminuição das metástases, mas sim se a inibição da quimiocina CCL2 (Ligando 2 de quimiocina com motivo C-C) em células mieloides, com alguma repercussão nas metástases do fígado, derivadas do carcinoma colorrectal. Esta quimiocina desencadeia o recrutamento das células mieloides presentes no cancro. O cancro e o comprometimento da sinalização de CCL2/CCR2 inibem o crescimento tumoral. Após simulação de metástases em ratinhos, através da inoculação de células do carcinoma do cólon, foram detectados infiltrados de CD11b/Gr1^{mid} (marcador clássico de linhas mieloides 11b e marcador granulocítico 1mid) associados a metástases hepáticas. Os níveis destes infiltrados sofreram um aumento brusco aquando do estabelecimento das metástases após o recrutamento por CCL2 derivadas do tumor. A inibição da sinalização de CCL2 e a ausência do seu receptor CCR2, reduziu este recrutamento e consequentemente o tumor. Conclui-se assim que as células mieloides, mais especificamente CD11b/Gr1^{mid}, estão associadas a metástases hepáticas do cancro colorrectal, sendo um potencial alvo para terapia anti-metastização. CCL2 tem a capacidade de inibir o crescimento tumoral, podendo ser manipulada pelo cancro. Desta forma, a inibição desta quimiocina melhora a metastização. Ficou comprovado que CCL2 apresenta um pontencial no tratamento anti-metastização.¹⁸⁴

Conseguiu-se verificar que elementos do microambiente tumoral, como as quimiocinas, podem ser potenciais alvos terapêuticos no tratamento anti-metastização. O facto de existirem múltiplos membros desta família, faz com que existam vários pontos a ter em consideração no combate da doença metastática através de quimiocinas.

3.2.3.4. Repressão da Colonização Metastática por LOXL2

Outro elemento importante do TME é a enzima lisil oxidase (LOX), induzida pela hipóxia que participa na colonização metastática, através da mobilização de células da medula óssea no nicho pré-metastático e nas alterações em ECM. As células tumorais em hipóxia são especialmente agressivas, metastáticas e resistentes à terapia. Um aumento do nível de LOX está associado ao processo de metastização, essencial para a metástase induzida por hipóxia.^{8,185}

Um ensaio pré-clínico comandado por Canasin, analisou a repressão da colonização metastática, através de LOXL2 (Proteína tipo lisil oxidase 2) e factor

E47 EMT em células do carcinoma da mama. A EMT proporciona às células tumorais a capacidade de invasão dos tecidos e promove a intravasação e o extravasamento. A regulação negativa da molécula de adesão E-caderina é mediada por factores de transcrição indutores de EMT como é o caso do E47, sendo um EMT-FT (Factores de transcrição que induzem EMT). Os resultados deste estudo demonstraram que a LOXL2 interage com E47 para colaborar na regulação negativa da transcrição de E-caderina. A interferência de ambos os factores, diminui o potencial metastático das células do cancro da mama malignas. Assim, em modelos celulares sob hipóxia, a LOXL2 secretada pelas células do carcinoma da mama, induz uma infiltração pulmonar e a colonização das células metastáticas. Conclui-se então que elevados níveis de LOXL2 podem promover a colonização precoce metastática. Este facto, juntamente com a regulação positiva de E47 presente em células do carcinoma primário da mama ajuda na progressão de metástases nestes tumores.¹⁸⁶

Pode dizer-se que a família de LOXL está associada à estimulação da metástase e desta forma poderá ser mais um possível alvo terapêutico no tratamento anti-metastização, uma vez que a sua presença promove a metastização e consequentemente, a sua inibição deverá diminuir este processo.

No TME também estão presentes exossomas, pequenas vesículas derivadas de células, que promovem comunicações entre células. Estas vesículas também têm um papel no nicho pré-metastático, angiogénese, função imune e comunicação entre células cancerosas e o microambiente. Contudo, a sua função depende das células de origem, bem como, das condições em que são produzidos. Determinados siRNAs (RNA silenciadores) exógenos foram veiculados em exossomas *in vivo*,¹⁸⁷ formulando-se a hipótese que as cargas supressoras de metástase poderiam ser desta forma, entregues nas células alvo.⁸

Vários ensaios clínicos foram iniciados de forma a explorar a utilização dos exossomas em doentes com cancro,¹⁸⁸ a capacidade destas vesículas de ativarem o sistema imunitário^{189,190} e ainda a sua utilização como forma de estimar respostas a terapias¹⁹¹. A promoção da metastização pelos exossomas ou supressão do sistema imunitário tem sido estudada como uma hipótese para o tratamento da doença metastática. Desta forma, um ensaio clínico irá acompanhar o comportamento das células imunes, os factores secretados e as exossomas libertados no sangue, antes, durante e após a terapia com radiação. Contudo, ainda não existem mais informações, uma vez que a data prevista para término do ensaio é Junho de 2018.¹⁹²

3.2.3.5. Bloqueio de CTLA4

A redução de uma metástase estabelecida é um grande desafio, sendo que uma das possíveis abordagens, para o seu tratamento se baseia na proteína 1 da morte celular programada (PD1 ou PDCD1) e CTLA4. Analisou-se ainda a eficácia do bloqueio de CTLA4, como imunoterapia adjuvante, para reduzir a recidiva metastática após cirurgia. Uma abordagem terapêutica possível para o bloqueio do CTLA4 é através do ipilimumab já descrito anteriormente.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

3.2.3.6. Bloqueio de PD1

Outra possível abordagem baseia-se na interação PD1-PDL1, tal como foi descrito anteriormente através do pembrolizumab, onde o bloqueio desta interação tem a capacidade de reduzir a doença metastática. Estas evidências permitiram posteriormente a aprovação de Pembrolizumab no tratamento do cancro metastático das células não pequenas do pulmão, como foi mencionado anteriormente nos fármacos anti-metastização em prática clínica.^{163,194}

Ao longo deste trabalho podemos constatar uma diversidade de abordagens relativas às novas terapias anti-metastização. Devido à complexidade do processo de metastização, tem-se procurado o tratamento eficaz nas diversas etapas deste processo, desde o processo de *seeding*, à dormência e à colonização metastática. Atualmente o maior alvo de investigação de novos alvos terapêuticos ocorre a nível da colonização metastática.

Capítulo 3 – Considerações Finais

O cancro é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública na atualidade. Consequentemente, o consumo de medicamentos oncológicos também tem sofrido um aumento progressivo e significativo nas últimas décadas. Relativamente à metastização verificou-se que as lesões secundárias ao tumor primário são a principal causa de morte para a maioria dos doentes com cancro metastático. Atualmente, está-se a procurar alterar este paradigma, estando a medicina a encontrar soluções terapêuticas para eliminar as células pré metastáticas e já metastizadas.

Esta dissertação procurou focar-se na metastização, e na dificuldade em travar este processo. Assim, verificou-se que quando disseminadas, as células tumorais, são altamente influenciadas pelo seu microambiente tumoral, composto por diversas células quer do próprio tumor quer ainda por células endoteliais, pericitos, células do sistema imunitário e fibroblastos associados ao tumor. Tornou-se claro que o desenvolvimento e a progressão do cancro não ocorre exclusivamente devido às células tumorais, mas tem que se considerar o microambiente envolvente.

Ao longo das últimas décadas, a doença metastática tem vindo a ser cada vez mais estudada e clarificada. A sua investigação tem permitido dar resposta a muitas perguntas, contudo ainda existem muitas outras perguntas sem resposta. Vários agentes têm sido estudados e demonstrados, procurando prevenir ou reduzir metástases. Já existem diversas terapias anti-metastização em prática clínica, aprovadas pela Food & Drug Administration. Hoje em dia já se encontram no mercado medicamentos capazes de reduzir as metástases, desde anticorpos monoclonais como o denosumab, bevacizumab, Ipilimumab, pembrolizumab e ainda, outros medicamentos aprovados tal como o crizotinib. Outros fármacos, apesar da sua eficácia em modelos pré-clínicos, nem sempre demonstraram grande eficácia quando estudados em humanos.

Atualmente, muitos investigadores procuram fornecer dados pré-clínicos que validem adequadamente potenciais agentes terapêuticos anti-metastização. Na presente dissertação, para além da terapêutica em prática clínica, também foram abordados os potenciais alvos terapêuticos anti-metastização que se encontram em investigação ainda em fase pré-clínica. Pela complexidade da doença metastática, verificou-se que existem diferentes abordagens a considerar durante a investigação

de potenciais alvos terapêuticos os quais vão desde a fase de *seeding*, passando pela fase de dormência, até à colonização metastática. Existem várias terapêuticas possíveis de ensaios pré-clínicos, tais como, as direccionadas para mutações no P53, capazes de levarem à plasticidade das células cancerosas: a supressão da metastização, através da quimiocina CXCL16 ou CCL2: a repressão da colonização metastática por LOXL2: o bloqueio do antigénio 4, associado aos linfócitos T citotóxicos e ainda bloqueadores de PD-1. Após os resultados positivos nos ensaios pré-clínicos, compete aos investigadores a continuação destes estudos que permitam alcançar resultados clínicos passíveis de levar a aprovação desses medicamentos, como terapias inovadoras no combate às metástases.

Muito do sucesso dos novos fármacos anti-metastização, advém de anos de investigação desenvolvidos por inúmeros investigadores. O cancro e mais especificamente, a metastização é a doença da atualidade e têm surgido e irão certamente continuar a surgir, cada vez mais terapias inovadoras e eficazes no combate às metástases. Apesar de toda a informação inerente a esta doença que foi e tem vindo a ser descoberta, sabemos que o tema é complexo e que ainda existem muitas perguntas que ainda permanecem sem resposta. Contudo, espera-se que o desenvolvimento da Ciência seja cada vez mais eficaz e que desenvolva os medicamentos “certos” que venham a possibilitar encontrar a cura do cancro e da metastização, irradicando do nosso planeta a doença considerada como a “doença do século”.

Capítulo 4 – Referências Bibliográficas

1. Jemal, A. *et al.* Cancer Statistics , 2009 BOTH SEXES FEMALE BOTH SEXES ESTIMATED DEATHS. *CA Cancer J Clin* **59**, 1–25 (2009).
2. WHO. The Global Burden of Disease. *World Health Organization* (2004).
3. MSD. Áreas Terapêuticas: Oncologia. (2016). at <<http://msd.pt/oncologia/>>
4. DGS. Portugal - Doenças Oncológicas em Números 2015. *Direção-Geral da Saúde* 66 (2015). at <<https://www.dgs.pt/>>
5. International Agency for Research on Cancer. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012 - GLOBOCAN 2012. *World Health Organization* (2012). at <<http://globocan.iarc.fr/>>
6. Tietze, L. F. & Feuerstein, T. Enzyme and proton-activated prodrugs for a selective cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 2155–75 (2003).
7. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. *World Health Organization* at <<http://gco.iarc.fr/today/explore>>
8. Steeg, P. S. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–18 (2016).
9. Lodish, A. F. *Molecular cell biology*. (W. H. Freeman and Company, 2004).
10. Lee, E. Y. H. P. & Muller, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, (2010).
11. Vazquez, F. & Devreotes, P. Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. *Cell Cycle* **5**, 1523–1527 (2006).
12. Roche. Sites temáticos: Infocancro.
13. Coleman, W. B. & Tsongalis, G. J. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *EXS* 321–349 (2006). doi:10.1159/000214918
14. Renan, M. J. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinog.* **7**, 139–146 (1993).
15. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
16. Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G. & Lollini, P. L. The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 319–326 (2000).
17. Mantovani, A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* **457**, 36–37 (2009).
18. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
19. Cheng, N., Chytil, a., Shyr, Y., Joly, a. & Moses, H. L. Transforming Growth Factor- Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor

- Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Mol. Cancer Res.* **6**, 1521–1533 (2008).
20. Conditions, G. Genetics Home Reference TP53 gene.
 21. Conditions, G. RB1 gene - Genetics Home Reference. 1–5 at <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/RB1>>
 22. Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323–330 (1995).
 23. Ji, P. *et al.* An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant. *Mol. Cell* **16**, 47–58 (2004).
 24. Burkhart, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 671–682 (2008).
 25. Riley, D. J., Lee, E. Y. & Lee, W. H. The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu. Biol.* **10**, 1–29 (1994).
 26. Binné, U. K. *et al.* Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit. *Nat. Cell Biol.* **9**, 225–232 (2007).
 27. Change, C., Suess, D. T., Kaufman, Y. J., Tanre, D. & Nakajima, T. Piecing Together the p53 Puzzle. *Science (80-)*. **287**, 1765–1766 (2000).
 28. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296–9 (1997).
 29. Ronit Vogt Sionov, Igal Louriya Hayon, and Y. H. The Regulation of p53 Growth Suppression. (2000). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/secure.sci-hub.bz/books/NBK6412/>>
 30. Grossmann, J. Molecular mechanisms of ‘ detachment-induced apoptosis — Anoikis ’. **7**, 247–260 (2002).
 31. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, a J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307–310 (2000).
 32. Momand, J., Wu, H.-H. & Dasgupta, G. MDM2 — master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**, 15–29 (2000).
 33. de Rozieres, S., Maya, R., Oren, M. & Lozano, G. The loss of mdm2 induces p53-mediated apoptosis. *Oncogene* **19**, 1691–1697 (2000).
 34. Kubbutat, M., Jones S., & V. K. Regulation of p53 stability by Mdm2.
 35. Lei, Jin. *et al.* Genetic Variation in MDM2 and p14ARF and Susceptibility to Salivary Gland Carcinoma. *PLOS* (2012). at <<http://journals.plos.org/sci-hub.bz/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049361>>
 36. Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. & Levine, A. J. The p53-mdm-2 autoregulatory

- feedback loop. *Genes Dev.* **7**, 1126–1132 (1993).
37. Sherr, C. J. The Pezcoller Lecture : Cancer Cell Cycles Revisited The Pezcoller Lecture : Cancer Cell Cycles Revisited - Unit 4. 3689–3695 (2000).
 38. Lockshin, R. A. & Williams, C. M. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect Physiol.* **10**, 643–649 (1964).
 39. Kerr JF., Wyllie AH., Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* (1972).
 40. Fadeel, B. & Orrenius, S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* **258**, 479–517 (2005).
 41. Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307–15 (2004).
 42. Evan, G. I. & Vousden, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342–348 (2001).
 43. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–37 (2007).
 44. Evan, G. I. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: hot or what? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 25–31 (2009).
 45. Ashkenazi, A., Dixit, V. M., Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Linked references are available on JSTOR for this article : Death Receptors : Signaling and Modulation. **281**, 1305–1308 (2016).
 46. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–6 (2000).
 47. Naismith, J. H. & Sprang, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 74–79 (1998).
 48. Daniel, P., Wieder, T., Sturm, I. & Schulze-Osthoff, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* **15**, 1022–1032 (2001).
 49. Wang, X. & Lin, Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 1275–1288 (2008).
 50. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z.-W. NF- κ B in Cancer: From Innocent Bystander To Major Culprit. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 301–310 (2002).
 51. Polager, S. & Ginsberg, D. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol.* **18**, 528–35 (2008).
 52. Kroemer, G. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **16**, 3–11 (2009).

53. Broker, L. E., Kruyt, F. A. E. & Giaccone, G. Cell death independent of caspases: A review. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3155–3162 (2005).
54. Joza, N. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549–554 (2001).
55. Petros, A. M., Olejniczak, E. T. & Fesik, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**, 83–94 (2004).
56. Murphy, K. M., Ranganathan, V., Farnsworth, M. L., Kavallaris, M. & Lock, R. B. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* **7**, 102–111 (2000).
57. Prager, G. W. & Poettler, M. Angiogenesis in cancer: Basic mechanisms and therapeutic advances. *Hamostaseologie* **32**, 105–114 (2012).
58. Prager, G. W. & Poettler, M. Angiogenesis in cancer. *Hamostaseologie* **32**, 105–114 (2011).
59. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L. & Montesano, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 824–831 (1992).
60. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy. *Nat. Publ. Gr.* **16**, 1107–1111 (2010).
61. Kazerounian, S., Yee, K. O. & Lawler, J. Thrombospondins: From structure to therapeutics - Thrombospondins in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 700–712 (2008).
62. Manuscript, A. & Syndromes, G. P. Heterogeneity of the Tumor Vasculature. **48**, 1–6 (2010).
63. Baluk, P., Hashizume, H. & M, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 102–111 (2005).
64. C M Counter, A A Avilion, C E LeFeuvre, N G Stewart, C W Greider, C B Harley, and S. B. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11(5)**, 1921–1929 (1992).
65. Rodriguez-Brenes, I. A., Wodarz, D. & Komarova, N. L. Minimizing the risk of cancer: tissue architecture and cellular replication limits. *J. R. Soc. Interface* **10**, 20130410 (2013).
66. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* **6**, 611–622 (2005).
67. Artandi, S. E. & DePinho, R. A. Telomeres and telomerase in cancer.

- Carcinogenesis* **31**, 9–18 (2009).
68. Berdasco, M. & Esteller, M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev. Cell* **19**, 698–711 (2010).
 69. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228 (2010).
 70. Salk, J. J., Fox, E. J. & Loeb, L. A. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu. Rev. Pathol.* **315**, 1650–1659 (1986).
 71. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, H. T. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 907–913 (2005). doi:10.1038/nature03492.1.
 72. Bartkova, J. *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864–870 (2005).
 73. Korkola, J. & Gray, J. W. Breast cancer genomes—form and function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 4–14 (2010).
 74. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–545 (2001).
 75. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
 76. Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* (2010).
 77. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular*. (Elsevier Inc., 2015).
 78. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
 79. Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annu. Rev. Immunol* **25**, 267–96 (2007).
 80. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).
 81. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073–1081 (2009).
 82. Boon, T., Coulie, P. G., Eynde, B. J. & Bruggen, P. V. Human T Cell Responses Against Melanoma. *Annu.Rev.Immunol.* **24**, 175–208 (2006).

83. Bogen, B. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: Deletion of CD4⁺ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2671–2679 (1996).
84. Staveley-O'Carroll, K. *et al.* Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**(3), 1178–1183 (1998).
85. Teng, M. W., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol* **84**, 988–993 (2008).
86. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1–14 (2007).
87. Vajdic, C. M. & Van Leeuwen, M. T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* **125**, 1747–1754 (2009).
88. Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R. & Johansson, C. C. Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* **107**, 57–117 (2010).
89. Zhou, S. T., Huang, C. H. & Wei, Y. Q. The metabolic switch and its regulation in cancer cells. *Sci. China Life Sci.* **53**, 942–958 (2010).
90. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20 (2008).
91. Waeburg, O. Uber den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Wien. Klin. Wochenschr.* 534–536 (1925).
92. Kennedy, K. M. & Dewhirst, M. W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Futur. Oncol.* **6**, 127–148 (2010).
93. Semenza, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625–634 (2009).
94. Carvalho, M. Padrão de Metastização Das Células Tumorais da Mama. (2010).
95. Bernacki, R. J. & Ph, D. Cancer Metastasis: A Search for Therapeutic Inhibition. **16**, 279–290
96. Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P. Metastasis: Cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 351–378 (2010).
97. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
98. Weigelt, B., Peterse, J. L. & van 't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 591–602 (2005).

99. Ewing, J. Neoplastic Diseases. *Br. J. Surg.* **16**, 174–175 (1928).
100. Weiss, L. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev.* **19**, 193–400 (2000).
101. Sugarbaker, E. V. Cancer metastasis: a product of tumour- host interactions. *Curr. Probl. Cancer* **3**, 1–59 (1979).
102. Fidler, I. J. & Kripke, M. L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science (80-.)*. **197**, 893–895 (1977).
103. Frost, P. & Fidler, I. J. Biology of metastasis. *Cancer* **58**, 550–553 (1986).
104. Whiteside, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* **27**, 5904–12 (2008).
105. Sun, C. *et al.* TGF-beta1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
106. Burnier, J. V. & Burnier, M. N. Experimental and clinical metastasis: A comprehensive review. *Exp. Clin. Metastasis A Compr. Rev.* **9781461436**, 1–472 (2013).
107. Boer, D. V. De. The role of the tumor microenvironment in metastasis studied by intravital imaging The role of the tumor microenvironment in metastasis studied by intravital imaging. (2011).
108. Woo, E. Y. *et al.* Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* **61**, 4766–72 (2001).
109. Draghiciu, O. *et al.* Myeloid derived suppressor cells — An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy Myeloid derived suppressor cells — An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. 1–10 (2015). doi:10.4161/21624011.2014.954829
110. Raza, A., Franklin, M. J. & Dudek, A. Z. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am. J. Hematol.* **85**, 593–598 (2010).
111. Olaso, E. *et al.* Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology* **26**, 634–42 (1997).
112. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 392–401 (2006).
113. Orimo, A. *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335–348 (2005).
114. Bissell, M. J. & Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* **1**,

- 46–54 (2001).
115. Ministério da Saúde. *Rede de Referência Hospitalar de Oncologia*. (2002). at <<http://www.acss.min-saude.pt/>>
 116. G.Geursen, R. *A Iniciativa Dos Medicamentos Inovadores. Medicamentos para a Humanidade: Investigar hoje para curar amanhã* (2007).
 117. Volk-Draper, L. *et al.* Paclitaxel therapy promotes breast cancer metastasis in a TLR4-dependent manner. *Cancer Res.* **74**, 5421–5434 (2014).
 118. Lin, T.-H. *et al.* Anti-androgen receptor ASC-J9 versus anti-androgens MDV3100 (Enzalutamide) or Casodex (Bicalutamide) leads to opposite effects on prostate cancer metastasis via differential modulation of macrophage infiltration and STAT3-CCL2 signaling. *Cell Death Dis.* **4**, e764 (2013).
 119. Guerin, E., Man, S., Xu, P. & Kerbel, R. S. A model of postsurgical advanced metastatic breast cancer more accurately replicates the clinical efficacy of antiangiogenic drugs. *Cancer Res.* **73**, 2743–2748 (2013).
 120. Gunjal, P. M. *et al.* Evidence for induction of a tumor metastasis-receptive microenvironment for ovarian cancer cells in bone marrow and other organs as an unwanted and underestimated side effect of chemotherapy/radiotherapy. *J. Ovarian Res.* **8**, 20 (2015).
 121. Sanchez-Laorden, B. *et al.* BRAF inhibitors induce metastasis in RAS mutant or inhibitor-resistant melanoma cells by reactivating MEK and ERK signaling. *Sci Signal* **7**, ra30 (2014).
 122. Pool, S. E. *et al.* mTOR inhibitor RAD001 promotes metastasis in a rat model of pancreatic neuroendocrine cancer. *Cancer Res.* **73**, 12–18 (2013).
 123. Fizazi, K. *et al.* Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: A randomised, double-blind study. *Lancet* **377**, 813–822 (2009).
 124. Stopeck, A. T. *et al.* Denosumab Compared With Zoledronic Acid for the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *J Clin Oncol* **28**, 5132–5139 (2010).
 125. Fizazi, K. *et al.* Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: A randomised, double-blind study. *Lancet* **377**, 813–822 (2011).
 126. Smith, M. R. *et al.* Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: Results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **379**, 39–46 (2011).
 127. Henry, D. H. *et al.* Randomized , Double-Blind Study of Denosumab Versus Zoledronic Acid in the Treatment of Bone Metastases in Patients With

- Advanced Cancer (Excluding Breast and Prostate Cancer) or Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1125–1132 (2011).
128. FDA. Prolia (Denosumab). *FDA* 1–20 (2011). at <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-bevacizumab>>
 129. FDA. XGEVA (Denosumab). *FDA* (2011).
 130. Richard Pazdur. FDA Approval for Denosumab. *National Cancer Institute* (2013). at <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-denosumab>>
 131. Escudier, B. *et al.* Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* **370**, 2103–2111 (2007).
 132. Rini, B. I. *et al.* Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5422–5428 (2008).
 133. Harshman, L. C., Barbeau, S., McMillian, A. & Srinivas, S. A phase II study of bevacizumab and everolimus as treatment for refractory metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Genitourin. Cancer* **11**, 100–106 (2013).
 134. Ebos, J. M. L. *et al.* Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell* **15**, 232–239 (2009).
 135. Hurwitz, H. *et al.* Bevacizumab plus Irinotecan, Fluoracil, and leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2335–2342 (2004).
 136. Hurwitz, H. I. *et al.* Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: An active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 3502–3508 (2005).
 137. Kozloff, M. *et al.* *Efficacy of bevacizumab plus chemotherapy as first - line treatment of patients with metastatic colorectal cancer : Updated results from a large observational registry in the US (BRiTE).* **24**, (2015).
 138. Cohen, M. H., Gootenberg, J., Keegan, P. & Pazdur, R. FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer. *Oncologist* **12**, 356–361 (2007).
 139. Pazdur, R. FDA Approval for Bevacizumab. *National Cancer Institute* (2014). at <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-bevacizumab>>
 140. Bennouna, J. *et al.* Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial POSITIVO OS !!! **2045**, 1–9 (2012).
 141. Rothschedl, Eleen; Nachtnebel, Anna; Bauer, J. Bevacizumab (Avastin®) as maintenance therapy after first progression on bevacizumab for patients with

- advanced colorectal carcinoma. *Ludwig Boltzmann Inst.* (2015). at <http://eprints.hta.lbg.ac.at>
142. K. Miller, M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E.A. Perez, T. Shenkier, D. Cella, N. E. D. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2666–2676 (2007).
143. Therapy, B. A. S. F. *ECOG Trial E2100: Paclitaxel Alone or with Bevacizumab.* **23**, (2005).
144. Walko, C. M., Lindley, C., Hill, C. & Carolina, N. Capecitabine : A Review. **27**, 23–44 (2008).
145. Lorusso, V. Bevacizumab in the treatment of HER2-negative breast cancer. *Biologics* **2**, 813–821 (2008).
146. Yang, J. C. *et al.* A Randomized Trial of Bevacizumab, an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody, for Metastatic Renal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**, 427–434 (2003).
147. Summers, J., Cohen, M. H., Keegan, P. & Pazdur, R. FDA drug approval summary: bevacizumab plus interferon for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* **15**, 104–111 (2010).
148. Limited, N. E. Resumo das Características do Medicamento: Everolimus. *Emea* 1–29 (2010). doi:10.1111/j.2047-2927.2014.00188.x
149. Flaherty, K. T. *et al.* BEST: A Randomized Phase II Study of Vascular Endothelial Growth Factor, RAF Kinase, and Mammalian Target of Rapamycin Combination Targeted Therapy With Bevacizumab, Sorafenib, and Temsirolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma--A Trial of the ECOG-ACRIN C. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2384–91 (2015).
150. Rini, B. I. *et al.* Randomized Phase III Trial of Temsirolimus and Bevacizumab Versus Interferon Alfa and Bevacizumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma: INTORACT Trial. *J. Clin. Oncol.* **32**, 752–759 (2014).
151. Penson, R. T. *et al.* Bevacizumab for advanced cervical cancer: Patient-reported outcomes of a randomised, phase 3 trial (NRG Oncology-Gynecologic Oncology Group protocol 240). *Lancet Oncol.* **16**, 301–311 (2015).
152. Pfizer. What is XALCORI? *XALCORI* (2016). at <https://www.xalkori.com/about-xalkori>
153. USA.gov. ALK gene. *Genetic Home Reference* (2011). at <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>
154. USA.gov. ROS1 gene. *Genetics Home Reference* (2017). at <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ROS1>

155. Shaw, A. T. *et al.* Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1963–1971 (2014).
156. Food & Drug Administration. FDA approval for Crizotinib. 2016 at <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm490329.htm>
157. Kwon, E. D. *et al.* Elimination of residual metastatic prostate cancer after surgery and adjunctive cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 15074–15079 (1999).
158. Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J. & Allison, J. P. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.* **206**, 1717–25 (2009).
159. Pazdur, R. FDA Approval for Ipilimumab. *National Cancer Institute* (2013). at <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-ipilimumab>
160. McDermott, D., Haanen, J., Chen, T. T., Lorigan, P. & O'Day, S. Efficacy and safety of ipilimumab in metastatic melanoma patients surviving more than 2 years following treatment in a phase III trial (MDX010-20). *Ann. Oncol.* **24**, 2694–2698 (2013).
161. Dolan, D. E. & Gupta, S. PD-1 pathway inhibitors: Changing the landscape of cancer immunotherapy. *Cancer Control* **21**, 231–237 (2014).
162. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).
163. U.S. Food & Drug Administration. Pembrolizumab (KEYTRUDA) Checkpoint Inhibitor. *U.S. Food & Drug Administration* (2016). at <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm526430.htm>
164. Kim, K. B. *et al.* A randomized phase II study of cilengitide (EMD 121974) in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res* **22**, 294–301 (2012).
165. Alva, A. *et al.* Phase II study of Cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in patients with non-metastatic castration resistant prostate cancer, NCI-6735. A study by the DOD/PCF prostate cancer clinical trials consortium. *Invest. New Drugs* **30**, 749–757 (2012).
166. Liu, Z., Wang, F. & Chen, X. Integrin $\alpha v \beta 3$ -targeted cancer therapy. *Drug Dev. Res.* **69**, 329–339 (2008).
167. Stupp, R. *et al.* Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3

- trial. *Lancet. Oncol.* **15**, 1100–1108 (2014).
168. Nabors, L. B. *et al.* Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol.* **25**, 1651–1657 (2007).
 169. Thomas, S. M. & Brugge, J. S. Cellular Functions Regulated By Src Family Kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **13**, 513–609 (1997).
 170. Kim, L. C., Song, L. & Haura, E. B. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 587–595 (2009).
 171. Shor, A. C. *et al.* Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on Src kinase for survival. *Cancer Res.* **67**, 2800–2808 (2007).
 172. Pazdur, R. FDA Approval for Dasatinib. *National Cancer Institute* (2013). at <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-dasatinib>>
 173. Gucalp, A. *et al.* Phase II trial of saracatinib (AZD0530), an oral SRC-inhibitor for the treatment of patients with hormone receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **11**, 306–311 (2011).
 174. Clark, W. M. *et al.* Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **353**, 977–987 (2012).
 175. Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114–1117 (2010).
 176. Ding, L. *et al.* Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* **464**, 999–1005 (2010).
 177. Taichman, R. S. *et al.* GAS6 Receptor Status Is Associated with Dormancy and Bone Metastatic Tumor Formation. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
 178. Lawson, M. A. *et al.* Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat. Commun.* **6**, 1–15 (2015).
 179. Bastid, J. EMT in carcinoma progression and dissemination: Facts, unanswered questions, and clinical considerations. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 277–283 (2012).
 180. Bonnomet, a *et al.* A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* 1–13 (2011). doi:10.1038/onc.2011.540
 181. Lenfert, E. *et al.* Mutant p53 promotes epithelial-mesenchymal plasticity and enhances metastasis in mammary carcinomas of WAP-T mice. *Int. J. Cancer* **136**, E521–E533 (2015).
 182. Ding, S. *et al.* Induction of an EMT-like transformation and MET in vitro. *J. Transl. Med.* **11**, 164 (2013).

183. Kee, J.-Y. *et al.* Chemokine CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer via augmentation of tumor-infiltrating natural killer T cells in a murine model. *Oncol. Rep.* **29**, 975–982 (2013).
184. Zhao, L. *et al.* Recruitment of a Myeloid Cell Subset (CD11b/Gr1. 829–839 (2012).
185. Erler, J. T. & Giaccia, A. J. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res.* **66**, 10238–10241 (2006).
186. Canesin, G. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) and E47 EMT factor: novel partners in E-cadherin repression and early metastasis colonization. *Oncogene* **34**, 951–64 (2015).
187. Pan, Q. *et al.* Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi). (2012). doi:10.1136/gutjnl-2011-300449
188. Medicine, U. N. L. of. Circulating Exosomes As Potential Prognostic And Predictive Biomarkers In Advanced Gastric Cancer Patients ('EXO-PPP Study'). *ClinicalTrials.gov* (2015). at <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01779583>>
189. Medicine, U. N. L. of. Interrogation of Exosome-mediated Intercellular Signaling in Patients With Pancreatic Cancer. *ClinicalTrials.gov* (2016). at <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02393703>>
190. Medicine, U. N. L. of. Pilot Immunotherapy Trial for Recurrent Malignant Gliomas. *ClinicalTrials.gov* (2013). at <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01550523>>
191. Medicine, U. N. L. of. Trial of a Vaccination With Tumor Antigen-loaded Dendritic Cell-derived Exosomes (CSET 1437). *ClinicalTrials.gov* (2010). at <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01159288>>
192. Medicine, U. N. L. of. Early Biomarkers of Tumor Response in High Dose Hypofractionated Radiotherapy Word Package 3 : Immune Response. *ClinicalTrials.gov* (2015). at <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02439008>>
193. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12293–7 (2002).
194. Pazdur, R. FDA approval of Pembrolizumab. *National Cancer Institute* (2014). at <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/pembrolizumab>>