

Guilherme João Marques da Costa Francisco

# Resistência Tumoral à Terapêutica Anti-angiogénica: Mecanismos de Refratariedade, a relação Redundante Tumor/Hospedeiro e Perspetivas Futuras

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Guilherme João Marques da Costa Francisco

**Resistência Tumoral à Terapêutica Anti-angiogénica:  
Mecanismos de Refratariedade, a relação Redundante  
Tumor/Hospedeiro e Perspetivas Futuras**

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Guilherme João Marques da Costa Francisco, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010125613, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

---

(Guilherme João Marques da Costa Francisco)

**O Tutor**

---

Professor Doutor João Nuno Moreira

**O Aluno**

---

Guilherme João Marques da Costa Francisco

Um agradecimento sincero ao Dr. João Nuno Moreira, pela orientação prestada.

Aos meus pais, avós, restante família e amigos, por tudo.

## Índice

Lista de abreviaturas utilizadas .....	i
Resumo .....	ii
<i>Abstract</i> .....	iii
1 Introdução.....	1
2 A angiogénese e o cancro .....	2
3 O VEGF como alvo terapêutico .....	3
4 A influência da hipóxia .....	4
5 A resistência tumoral a fármacos anti-angiogénicos: o ambiente microtumoral e os principais <i>pathways</i> envolvidos.....	5
5.1 Resistência adaptativa .....	6
5.1.1 A <i>upregulation</i> de fatores pró-angiogénicos alternativos .....	6
a) PDGF-C.....	6
b) EGFR.....	7
c) FGF.....	8
d) Ang/Tie .....	9
e) c-Met (ou HGFR).....	9
f) SDF-1 .....	10
5.1.2 Recrutamento de células derivadas da medula óssea .....	10
5.1.3 Os pericítos e o suporte à integridade vascular .....	11
5.1.4 A activação e estimulação de um fenótipo tumoral mais invasivo e metastático .....	11
5.1.5 A co-opção vascular.....	13
5.2 Resistência intrínseca .....	13
5.2.1 Polimorfismos e diferente grau de expressão das isoformas do VEGF.....	13
5.2.2 A redundância de fatores pró-angiogénicos num contexto prévio à terapêutica .....	14
5.2.3 A pré-existência de células inflamatórias pró-angiogénicas.....	15
5.2.4 A dependência da co-opção vascular no microambiente tumoral.....	15
5.2.5 A hipovascularidade e a indiferença aos inibidores da angiogénese .....	16
6 A terapêutica anti-angiogénica: perspetivas atuais e futuras .....	17
7 Conclusão .....	21
8 Bibliografia.....	22

### **Lista de abreviaturas utilizadas**

Ang – angiopoietina

BMDC – células derivadas da medula óssea

c-KIT – recetor tirosina cinase do fator de crescimento de células estaminais/mastócitos

CSF-IR – recetor do fator estimulador de colónias I

CXCR-4 – Recetor tipo 4 de quimiocina C-X-C

EGF – fator de crescimento epidermal

EGFR – recetor do fator de crescimento epidermal

FGF – fator de crescimento fibroblástico

FGFR – recetor do fator de crescimento fibroblástico

FLT3 – tirosina-cinase *Fml-like*

G-CSF – fator de estimulação de colónias de granulócitos

HGF – fator de crescimento dos hepatócitos

HGFR – recetor do fator de crescimento dos hepatócitos

HIF – fator indutível por hipóxia

MMP9 – metaloproteinase da matriz 9

OPN – osteopontina

OS – sobrevida global

PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas

PDGFR – recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas

PFS – sobrevida livre de progressão

PIGF – fator de crescimento placentário

RTKI's – inibidores dos recetores tirosina-cinase

SDF-1 – fator derivado do estroma I

SNP – polimorfismos de nucleótido único

TAF – fibroblastos associados a tumores

TAM – macrófagos associados a tumores

TEM – monócitos que expressam Tie-2

Tie – tirosina cinase com domínios imunoglobulina-*like* e EGF-*like*

TP53 – gene codificante da proteína tumoral p53

VDA – agentes disruptores vasculares

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR – recetor do fator de crescimento endotelial vascular

## Resumo

A dependência tumoral perante a angiogénese patológica entusiasmou a comunidade científica nas últimas décadas, a qual foi presenteada com uma nova área terapêutica até então desconhecida. A eventual estabilidade genética das células endoteliais e o desenvolvimento de resistências potencialmente leves constituíram dois fatores que pareciam indicar a descoberta de um novo alvo terapêutico promissor na área oncológica e noutras patologias com bases angiogénicas. A associação do VEGF – fator de crescimento endotelial vascular – à angiogénese, como um elemento chave na regulação deste processo, fortaleceu essas ambições, tendo esta molécula concentrado a maioria das atenções com o propósito da sua inibição farmacológica.

Contudo, os longos anos de estudos científicos têm permitido concluir que, ao contrário que seria esperado, as capacidades evasivas tumorais face à terapêutica anti-angiogénica traduzem-se no desenvolvimento de resistências associadas. Embora existam alguns fármacos anti-angiogénicos atualmente aprovados para determinados tipos de cancro, diversos doentes personificam a falta de eficácia desta terapêutica. Esta heterogeneidade, explicada por diversos mecanismos tumorais que têm vindo a ser desvendados, requer um conhecimento mais aprofundado destes processos e um regime terapêutico personalizado, preditivo e específico para cada subgrupo de doentes.

Com a presente monografia pretendem-se resumir os principais marcos científicos no âmbito desta vertente terapêutica e analisar o panorama atual e futuro relativo à sua utilização eficiente e segura.

Palavras-chave: Angiogénese; Cancro; Resistência à Terapêutica Anti-Angiogénica.

## **Abstract**

Tumoral dependency of pathological angiogenesis has excited the scientific community over the last few decades, which was presented with a previously unknown therapeutic area. Endothelial cells' possible genetic stability and the development of potentially slight resistances resulted in two factors that seemed to indicate the discovery of a new promising therapeutic target in the fields of oncology and other angiogenesis-based diseases. The association of VEGF – vascular endothelial growth factor – with angiogenesis, as a key element in the regulation of this process, has strengthened those ambitions, as this molecule has been gaining focus for the purpose of its pharmacological inhibition.

However, long years of scientific studies have permitted to conclude that, as opposed to what was expected, tumoral evasive capabilities towards anti-angiogenic therapy have led to the development of associated resistances. Although there are some anti-angiogenic drugs already approved in the present for certain types of cancer, multiple patients personify the lack of therapeutic efficacy. This heterogeneity, explained by various tumoral mechanisms that have been unraveled, implies a deeper knowledge of these processes and a personalized, predictive and patient subgroup-specific therapeutic regimen.

With the present review it is intended to summarize the main scientific events within this therapeutic branch and to analyze the present and future prospects related to its efficient and safe use.

Keywords: Angiogenesis; Cancer; Resistance to Anti-angiogenic Therapy.

## I Introdução

O cancro, um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento e proliferação anormal de células no organismo de indivíduos, tem vindo a concentrar atenções e os mais variados esforços científicos ao longo das últimas décadas, com o propósito de alcançar uma terapêutica eficaz contra um dos maiores flagelos da sociedade atual.

Apenas em 2012, as previsões estimavam que existiam 14,2 milhões de novos casos diagnosticados de cancro no mundo, com 8,2 milhões de mortes relacionadas com este conjunto de patologias. Contudo, estes valores tenderão a aumentar até ao ano de 2030, no qual as previsões apontam para a meta de 21,7 milhões de novos casos relacionados com cancro e 13 milhões de mortes daí resultantes, apenas no decorrer desse ano. Dados indicam que cerca de uma em cada sete mortes, no mundo, tem como causa o cancro<sup>(1)</sup>. O impacto deste conjunto de doenças revela, portanto, a necessidade e urgência acrescida da descoberta de uma terapêutica mais eficaz e com melhores índices de tolerabilidade.

Na década de 70, o investigador americano Judah Folkman propôs o conceito de angiogénese, teoria na qual inferiu que os tumores requerem vasos sanguíneos para se desenvolverem e, conseqüentemente, se esse abastecimento for interrompido, poderiam eventualmente estagnar a sua evolução e entrar em remissão<sup>(2)</sup>. Desde então, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos em torno desta excitante hipótese terapêutica, tendo-se obtido resultados interessantes que, na sua maioria, recaem na investigação sobre o papel dos fatores pró-angiogénicos tumorais no processo cancerígeno e no desenvolvimento de fármacos com vista a sua inibição.

Contudo, a elevada complexidade da rede de sinalizadores tumorais, a relação redundante tumor-hospedeiro e a exímia capacidade adaptativa destas estruturas tem-se traduzido numa resistência tumoral à terapêutica anti-angiogénica que, por sua vez, veio colocar entraves e desafiar a promissora teoria inicialmente proposta.

## 2 A angiogénese e o cancro

Os vasos sanguíneos são as estruturas do organismo responsáveis pelo transporte do oxigénio e nutrientes necessários às células, através do sangue, bem como dos produtos do metabolismo celular. As células endoteliais revestem a camada mais interna dos vasos, ao passo que a estrutura externa é coberta pelos pericítos (também designados de células murais, perivascularres ou pericapilares)<sup>(3,4)</sup>.

A angiogénese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, através da migração, crescimento e diferenciação de células endoteliais. Este processo inicia-se com a ativação e agrupamento, por ação de fatores pró-angiogénicos, de células endoteliais precursoras, cuja membrana basal e respetivas junções comunicantes são remodeladas em conjunto com a separação dos pericítos. Este processo orquestrado prossegue com a migração de uma célula, a *tip cell*, escolhida para liderar o brotamento vascular. O alongamento da estrutura é providenciado pelas restantes células, às quais se juntam outras *tip cells* de outros vasos, ocorrendo uma anastomose. Forma-se uma rede imatura de capilares, cujo plexo se expande de maneira progressiva até originar uma rede mais complexa de vasos sanguíneos. Estes são posteriormente cobertos por pericítos e células do músculo liso, etapa que é conhecida como arteriogénese<sup>(5,6)</sup>.

O balanço de sinais químicos (fatores pró e anti-angiogénicos proteicos) em circulação no organismo permite controlar este processo natural e essencial, por exemplo, na regeneração de tecidos e na reprodução, sendo limitado no tempo. Contudo, a criticidade da angiogénese também se manifesta quando surge um desequilíbrio nesta relação (“*switch*” angiogénico), o qual pode estar na génese de diversas doenças de cariz importante, nomeadamente relacionadas com o cancro. Nesta situação de angiogénese patológica, a excessiva concentração de sinais químicos que favorecem o processo angiogénico contrabalança a atividade dos fatores anti-angiogénicos, uma condição que pode durar vários anos<sup>(7)</sup>.

Muitos tumores possuem a capacidade de desenvolvimento e maturação através da produção destas moléculas, as quais permitem oxigenar o meio tumoral e fornecer-lhe os nutrientes necessários. É conhecida a dependência tumoral do processo angiogénico, tendo-se inicialmente reiterado a hipótese de que uma terapêutica anti-tumoral inibitória dos fatores pró-angiogénicos poderia estar na base de um novo alvo suscetível, específico e com um desenvolvimento mínimo de resistência associada, uma vez que não atuava diretamente nas células tumorais<sup>(8)</sup>.

### 3 O VEGF como alvo terapêutico

O processo patológico associado à angiogénese tumoral foi, até hoje, intensamente estudado e relacionado com a sobre-expressão de inúmeras moléculas. Contudo, a que mais se tem destacado como crucial no processo regulatório da formação patológica de vasos sanguíneos é o VEGF – fator de crescimento endotelial vascular – e os seus recetores.

O VEGF, descrito pela primeira vez em 1983<sup>(9,10)</sup>, representa uma fração integrante de uma vasta família de hormonas e moléculas de sinalização extracelulares<sup>(2)</sup>, sendo constituído por diversos membros: VEGF-A, o VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o fator de crescimento placentário PlGF<sup>(2-4)</sup>. A atividade destas glicoproteínas é mediada pelos seus recetores tirosina-cinase (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3).

O VEGF-A é frequentemente referido de forma simplista como VEGF, tendo sido o primeiro elemento da família a ser estudado e o mais intensamente implicado na angiogénese patológica<sup>(9, 11-14)</sup>. A sua estrutura consiste num dímero formado por dois monómeros de cisteína unidos por ligações dissulfito, possuindo afinidade para os recetores tirosina-cinase VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1/KDR), sendo o último o responsável por mediar a maior parte das respostas celulares ao VEGF. São conhecidas diversas isoformas traduzidas a partir do gene VEGF e do *splicing* alternativo a que é sujeito, sendo que este fator de crescimento pode ser encontrado, em maiores quantidades, nos pulmões, rins, coração e glândula adrenal de adultos<sup>(15)</sup>. Contudo, a sua expressão aumentada tem sido detetada em inúmeros casos de situações patológicas, nomeadamente em diversos tipos de cancro<sup>(10)</sup>.

A partir da década de 80 e tendo em conta o papel crítico do VEGF na angiogénese como base do desenvolvimento tumoral, este novo alvo farmacológico foi, naturalmente, intensamente investigado. Diversas moléculas foram descobertas, mas dois grupos de fármacos podem ser destacados tendo em conta a sua aplicação prática na terapêutica: os anticorpos monoclonais e os inibidores dos recetores da tirosina cinase (RTKI's).

Em 2004, a FDA aprovou o bevacizumab, o primeiro fármaco desenvolvido exclusivamente como inibidor da angiogénese, com indicação terapêutica para o cancro colo-rectal (em combinação com regimes padrão de quimioterapia) e, mais recentemente, para outros tipos, como o cancro do pulmão<sup>(16, 17)</sup>. Esta molécula consiste num anticorpo monoclonal humanizado e recombinado com capacidade para se ligar e neutralizar o VEGF, impedindo a ligação deste ao recetor VEGFR-2 e consequente fosforilação que culminaria na indução de diversas proteínas a nível endotelial e na ativação do processo angiogénico.

Outra abordagem foi desenvolvida, tendo-se recorrido aos inibidores dos recetores tirocina cinase (RTKI's), como o sunitinib ou o sorafenib, que atuam pela ligação aos recetores do VEGF e conseqüente inibição de vários *pathways* de sinalização intracelular envolvidos na angiogénese<sup>(17)</sup>. Pelo seu carácter hidrofílico e pela sua pequena dimensão, conseguem penetrar na membrana celular e exercer a sua atividade dentro das células, o que os diferencia dos anticorpos monoclonais, que atuam no espaço extracelular.

Embora os fármacos referidos possuam aprovações para o tratamento de determinados tipos de cancro, a sua eficácia pode ser fortemente contrabalançada pelo desenvolvimento de resistências associadas. O foco farmacológico nas células endoteliais, as quais eram rotuladas de geneticamente estáveis, em detrimento das células cancerígenas, parecia indicar a existência de efeitos secundários relativamente levianos, comparativamente ao que sucede na quimioterapia habitual<sup>(18)</sup>. Contudo, estudos recentes sugerem a existência de diversas mutações nas células endoteliais associadas a tumores, colocando-se a hipótese de que, contrariamente ao que inicialmente se supunha, estas anormalidades citogenéticas podem contribuir para o desenvolvimento de resistências<sup>(19)</sup>. A irregularidade e o complexo funcionamento mecanístico envolvido na angiogénese tumoral consolidou alguns cenários negativos, com a existência de resistências manifestadas de diversas formas, nomeadamente através da progressão tumoral para um fenótipo mais agressivo, a redundância dos fatores pró-angiogénicos, o recrutamento de células derivadas da medula óssea, entre outros<sup>(20)</sup>.

Por estes motivos, é de crucial importância perceber os mecanismos que levam ao desenvolvimento das referidas resistências e em que medida é que estas podem ser antecipadas e, idealmente, evitadas durante a terapêutica.

#### **4 A influência da hipóxia**

A imposição de um regime terapêutico assente em fármacos anti-angiogénicos possibilita a redução do crescimento tumoral (“regressão vascular”), mas numa extensão inferior à qual seria desejada, tal como registado em diversas observações efetuadas. Um mecanismo que aparenta ter um papel inerente a estes resultados consiste no desenvolvimento de um ambiente hipóxico em resposta à terapêutica anti-angiogénica. Nesta fase, o principal regulador da atividade angiogénica é o HIF (factor indutível por hipóxia)<sup>(21,22)</sup>.

O HIF é um fator de transcrição cuja atividade é regulada pela presença de oxigénio, sendo ativado em condições de hipóxia. A sua forma ativa é composta por duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e por co-ativadores, mas apenas a fração HIF- $\alpha$  é regulada pela presença de oxigénio, ao passo que a HIF- $\beta$  apresenta funções adicionais distintas da primeira. Existem três formas

de HIF- $\alpha$  humana: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ . As duas primeiras apresentam funções relacionadas, nomeadamente no que diz respeito à sua regulação pelos níveis de oxigénio no organismo, ao passo que o papel da HIF-3 $\alpha$  ainda não é completamente conhecido<sup>(18, 23)</sup>. Em condições de normóxia, as subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  são degradadas através de processos de hidroxilação e posterior ligação a complexos de ubiquitina. A diminuição dos níveis de oxigénio até níveis hipóxicos traduz-se num processo de hidroxilação mínimo, ou inexistente, o qual permite às frações HIF- $\alpha$  evitar a degradação proteossómica e tornarem-se ativas. É nesta fase que a ação angiogénica do HIF se manifesta, através da sua capacidade regulatória de genes (dos quais são exemplos o VEGF, PlGF, FGF, PDGF, Ang-1 e Ang-2, entre outros) e que permite a adaptação e sobrevivência celular tumoral em condições de hipóxia<sup>(18, 21)</sup>. O HIF- $\alpha$  medeia também o consumo de oxigénio, a migração e a invasão de células tumorais<sup>(23)</sup>, bem como os níveis de óxido nítrico (NO) a nível celular. A regulação do NO pelas isoformas HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  depende da expressão diferencial entre ambas, uma vez que a perda da HIF-1 $\alpha$  nas células endoteliais reduz a síntese de NO e, conseqüentemente, retarda a migração das células tumorais, restringindo o potencial metastático. Por seu lado, a perda da isoforma HIF-2 $\alpha$  induz os efeitos contrários<sup>(24)</sup>.

Assim, o papel da hipóxia na ativação e sobreexpressão de fatores e recrutamento de células derivadas da medula com atividade pró-angiogénica é fulcral em diversos tumores e, por isso, tem sido cada vez mais indicado como um possível alvo terapêutico no combate ao cancro<sup>(22, 23, 25)</sup>.

## **5 A resistência tumoral a fármacos anti-angiogénicos: o ambiente microtumoral e os principais *pathways* envolvidos**

O volume de dados obtidos ao longo de anos de estudo em torno da terapêutica anti-angiogénica permitiu distinguir dois tipos essenciais de mecanismos de resistência: a resistência adaptativa (adquirida) e a resistência intrínseca<sup>(20, 26, 27)</sup>.

A resistência adaptativa surge em resposta à terapêutica instituída, resultando numa reação evasiva do tumor em prol da sua sobrevivência. A inibição do VEGF, por exemplo, pode desencadear diversos mecanismos que permitem ao tumor prosseguir o seu desenvolvimento. Após uma resposta terapêutica inicialmente favorável, ocorre um relapso, através de processos tais como: a ativação e/ou *upregulation* (aumento da produção) de fatores pró-angiogénicos alternativos; o recrutamento de células derivadas da medula óssea com capacidade pró-angiogénica; o aumento da cobertura pericítica como suporte à

integridade vascular; a ativação e estimulação de um fenótipo tumoral mais invasivo e metastático; a co-opção vascular<sup>(28, 29)</sup>.

Alternativamente, certos tumores podem, à partida, não exibir qualquer resposta à terapêutica anti-angiogénica, um comportamento que é condicionado, ao longo do desenvolvimento tumoral, pelas suas características genéticas e por pressões seletivas do microambiente em que estão inseridos. A resistência intrínseca define a refratariedade inerente a este tipo de situações, podendo manifestar-se em resultado de: polimorfismos e diferente grau de expressão das isoformas do VEGF; a redundância de fatores angiogénicos num contexto prévio à terapêutica; a pré-existência de células inflamatórias pró-angiogénicas; a dependência da co-opção vascular no microambiente tumoral; a hipovascularidade ligada à indiferença aos inibidores da angiogénese<sup>(28, 29)</sup>.

## 5.1 Resistência adaptativa

### 5.1.1 A *upregulation* de fatores pró-angiogénicos alternativos

Apesar da inicial receção da comunidade científica à inovadora terapêutica baseada em agentes anti-angiogénicos, cedo se percebeu que a resposta tumoral nem sempre se desenvolvia de acordo com as expectativas geradas. Entre as observações efetuadas, inúmeros estudos têm vindo a referir que a inibição do VEGF, embora inicialmente eficaz, pode levar à ativação de mecanismos de evasão conducentes a uma resposta tumoral angiogénica envolvendo a alternância entre *pathways*, nomeadamente através da *upregulation* de outros fatores pró-angiogénicos. De seguida serão expostos apenas alguns dos exemplos mais citados nos estudos clínicos realizados e na literatura disponível, sendo relevante referir que o tipo de tumor e o ambiente microtumoral na qual este se desenvolve irão condicionar a evolução da resistência e o repertório de fatores expressos.

#### a) PDGF-C

Um dos fatores de crescimento que tem vindo a ser associado ao desenvolvimento de resistências à terapêutica anti-angiogénica é o PDGF-C (fator de crescimento derivado das plaquetas C)<sup>(30-33)</sup>.

A família do PDGF abrange elementos cuja estrutura inclui heterodímeros unidos por ligações dissulfito, os quais conservam oito resíduos de cisteína, à semelhança do que ocorre no VEGF, formando cadeias polipeptídicas A e B (PDGF-A e PDGF-B)<sup>(34)</sup>. Os seus recetores tirosina cinase, designados por  $\alpha$  (PDGFR- $\alpha$ ) e  $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ), possuem afinidade para os homodímeros PDGF-AA, PDGF-BB e para o heterodímero PDGF-AB. Contudo, após anos

de estudo, foi descoberto um novo membro desta família de fatores de crescimento, designado por PDGF-C, que tem vindo a ser implicado no desenvolvimento de resistências associadas à terapêutica anti-angiogénica<sup>(30,33,35,36)</sup>. De referir também a existência de um quarto membro, o PDGF-D<sup>(37)</sup>.

Atualmente, inúmeros casos exemplificativos do surgimento de resistências associadas à terapêutica anti-VEGF e à ação do PDGF-C estão retratados, sendo que se tem vindo a tentar esclarecer os mecanismos associados a este processo. O papel dos TAF's (fibroblastos associados a tumores), presentes em tumores refratários à terapêutica anti-VEGF, parece envolver a *upregulation* dos níveis de PDGF-C no ambiente microtumoral, podendo constituir um alvo terapêutico viável<sup>(31)</sup>. A inibição farmacológica conjunta do PDGF-C e do VEGF em modelos tumorais permitiu inferir que, de facto, o nível de desenvolvimento tumoral é menor face aos resultados obtidos em monoterapia anti-VEGF, provando a capacidade de evasão terapêutica através da angiogénese estimulada pelo PDGF-C, independente do VEGF<sup>(31,32)</sup>. Adicionalmente, o envolvimento do PDGF-C na resistência à terapêutica anti-VEGF aparenta variar consoante o microambiente tumoral em causa. No cérebro, mais concretamente em modelos de glioblastoma multiforme, foi proposto um papel do PDGF-C que consiste no recrutamento de pericitos e no fortalecimento e normalização da estrutura vascular, aquando da inibição do VEGF<sup>(33)</sup>.

Ainda assim, os diversos estudos efetuados referem que terapêuticas que inibam os dois factores de crescimento indicados não são suficientes para atingir os objetivos terapêuticos propostos, sendo que a inibição alternativa do recetor do PDGF poderá implicar toxicidade adicional<sup>(30)</sup>. Mais uma vez, a complexidade mecanística tumoral traduzida pela *upregulation* de fatores pró-angiogénicos, em detrimento daqueles cuja expressão está diminuída, volta a frisar a grande capacidade adaptativa destas estruturas.

## **b) EGFR**

Outro fator angiogénico envolvido no desenvolvimento de resistência associada à terapêutica anti-VEGF é o EGFR (recetor do fator de crescimento epidermal) - ou HER1 - da família dos recetores tirosina cinase, dos quais também fazem parte o HER2/neu, HER3 e HER4<sup>(38)</sup>. Para além de estudos que apontam para a existência de mutações específicas no gene codificante do fator referido e que, por sua vez, levam ao desenvolvimento de resistências associadas, sobretudo, ao cancro do pulmão<sup>(39-41)</sup>, outros estudos consolidam a ideia de que a *upregulation* de fatores envolvidos na angiogénese, neste caso o EGFR, é um passo fulcral no desenvolvimento de resistência a fármacos. Mais uma vez, o papel das células

## Resistência Tumoral à Terapêutica Anti-angiogénica: Mecanismos de Refratariedade, a Relação Redundante Tumor/Hospedeiro e Perspetivas Futuras

do estroma face às células tumorais revela-se de igual, ou maior, importância neste aspeto, tendo em conta a sobreexpressão de EGFR detetada nos pericítos dos modelos estudados (cancro do pulmão de não-pequenas células), estimulada pela terapêutica anti-VEGF.

De acordo com as evidências obtidas, a resposta adaptativa do estroma desencadeada pela terapêutica anti-VEGF pode envolver essencialmente dois processos de resistência mediante o próprio tipo de tumor. Nos casos em que o tumor possui uma resistência intrínseca, ocorre o favorecimento de uma revascularização tortuosa, semelhante a “brotamentos”, com uma cobertura pericítica irregular. Por outro lado, uma resistência adaptativa pode desenvolver-se após uma resposta inicialmente favorável à terapêutica anti-VEGF, com possível diminuição de tamanho do tumor, mas que evolui rapidamente para uma estrutura vascular eficiente e normalizada, coberta por pericítos. Em ambos os casos, níveis elevados de EGFR foram detetados, demonstrando, mais uma vez, a capacidade de evasão tumoral face à inibição do *pathway* do VEGF <sup>(26,42)</sup>.

A inibição terapêutica conjunta do VEGF e do EGFR foi testada, tendo sido registadas melhorias relativamente a uma terapia anti-VEGF isolada (bevacizumab), manifestadas por uma diminuição da cobertura pericítica vascular. Assim, nos modelos estudados é possível relacionar a atividade do EGFR com um papel ativo no recrutamento de pericítos em ambiente tumoral. Contudo, esta terapia não suscitou resultados significativos em termos de OS (sobrevida global)<sup>(26)</sup>. Adicionalmente, outros estudos revelam que a inibição dupla VEGF/EGFR não apresenta vantagens terapêuticas, chegando mesmo a referir um aumento de toxicidade e diminuição da PFS (sobrevida livre de progressão) em situações de cancro colo-rectal metastático<sup>(43)</sup>. Estes resultados, aparentemente contraditórios, revelam que a resistência a fármacos anti-angiogénicos pode apresentar uma especificidade para o tipo de doença ou regime terapêutico em vigor<sup>(26)</sup>.

### c) FGF

De forma similar, o FGF (fator de crescimento dos fibroblastos) pode ser incluído no grupo das moléculas envolvidas na angiogénese patológica. A família dos FGF compreende diversos elementos, sendo que estes possuem elevada afinidade para os proteoglicanos de heparina sulfato, os quais atuam como co-receptores dos recetores FGF (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4). Estes apresentam uma estrutura tirosina-cinase, à semelhança do que ocorre nos recetores VEGFR, EGFR e PDGFR. Dos diversos elementos constituintes desta família, o FGF-2 (ou bFGF) tem sido o mais implicado na angiogénese tumoral <sup>(18, 26)</sup>.

## Resistência Tumoral à Terapêutica Anti-angiogénica: Mecanismos de Refratariedade, a Relação Redundante Tumor/Hospedeiro e Perspetivas Futuras

Em modelos animais com uma forma de cancro do pâncreas, a terapêutica anti-VEGF (bevacizumab) suscitou, mais uma vez, uma resposta inicialmente favorável (diminuição do tamanho do tumor), após a qual surgiu um novo desenvolvimento tumoral que consumou a resistência anti-angiogénica. Foi detetada uma quantidade superior de mRNA relativa aos genes codificantes dos FGF-1 e FGF-2, comparativamente aos modelos de controlo, a qual também foi relacionada com regiões do tumor que apresentavam níveis de hipoxia mais elevados. A terapêutica inibitória combinada (VEGF/FGF) mostrou ser mais eficaz face a uma monoterapia anti-VEGF, provando o envolvimento do fator de crescimento referido na angiogénese patológica deste modelo animal<sup>(28,44)</sup>.

### **d) Ang/Tie**

A família das angiopoietinas engloba diversos ligandos, nomeadamente Ang-1, Ang-2 e Ang-3/4, os quais podem interagir com os recetores tirosina cinase Tie-1 e Tie-2. A Ang-1, que participa na maturação dos vasos sanguíneos e na migração, adesão e sobrevivência das células endoteliais, e a Ang-2, que possui capacidade para, em conjunto com o VEGF, promover a angiogénese, representam os ligandos mais estudados na família das angiopoietinas<sup>(45)</sup>. O mecanismo comumente designado por Ang/Tie tem um papel influente no processo angiogénico, dada a afinidade das Ang-1 e Ang-2 para o recetor Tie-2 e o efeito pró-angiogénico que daí resulta em diversos tipos de cancro<sup>(18, 46)</sup>. Foi também previamente reportada a acção dos TEM (monócitos que expressam Tie-2) na evasão à terapêutica anti-VEGF. Produzida pelas células tumorais, a Ang-2 exerce um efeito quimiostático sobre os TEM que resulta na sobre-expressão dos recetores Tie-2 desencadeada pela hipoxia<sup>(47)</sup>.

### **e) c-Met (ou HGFR)**

O c-Met, ou HGFR (recetor do fator de crescimento dos hepatócitos), é o recetor tirosina cinase do ligando HGF, com atividade importante na regulação da migração e proliferação celular na angiogénese. Este mecanismo pode ser ativado mediante três processos essenciais: produção autócrina ou parócrina do HGF, amplificação do gene *c-Met* e através de mutações no recetor c-Met<sup>(48, 49)</sup>. Em diversas instâncias, este mecanismo foi intimamente relacionado com o desenvolvimento de resistências tumorais após terapêutica anti-angiogénica com inibidores do VEGF, associadas à presença de hipoxia<sup>(48-50)</sup>.

## **f) SDF-1**

O fator derivado do estroma I (SDF-1), também designado por CXCL-12, junta-se ao grupo de fatores de crescimento associados à sobrevivência celular tumoral<sup>(51, 52)</sup>. Trata-se de uma quimiocina, apresentando ação sobre os leucócitos B (promovendo o seu crescimento e maturação), leucócitos T e monócitos (efeito quimiostático) e está envolvida em processos inflamatórios<sup>(52-54)</sup>. O seu papel de promoção da vasculogénese foi reportado em modelos de glioma intracraniano, isoladamente e, em maior expressão, em conjunto com o VEGF<sup>(51)</sup>. Contudo, a presença desta molécula como parte integrante do processo tumoral foi verificada em diversos tipos de cancro<sup>(54)</sup>.

### **5.1.2 Recrutamento de células derivadas da medula óssea**

A terapêutica anti-angiogénica pode desencadear outro tipo de respostas por parte do tumor, nomeadamente através do efeito quimiostático exercido sobre células derivadas da medula óssea (BMDC) que possuem propriedades pró-angiogénicas. Frequentemente, este tipo de recrutamento celular surge em resposta a um ambiente hipóxico induzido pela terapêutica e envolve células progenitoras e moduladoras vasculares (endoteliais, pericíticas e monocíticas), das quais são exemplo linhagens de hemangiócitos, os TEM, os TAF, os TAM, as células supressoras mielóides Gr+CD11b+, entre outros<sup>(19, 22, 29)</sup>.

O G-CSF (fator de estimulação de colónias de granulócitos) é uma glicoproteína com capacidade para estimular a produção da proteína pró-angiogénica Bv8 (ou PROK2)<sup>(55, 56)</sup>, na medula óssea e nas células Gr+CD11b+<sup>(6, 57)</sup>. Por sua vez, as células Gr+CD11b+ representam um conjunto heterogéneo de células mielóides progenitoras que incluem neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos, cuja presença em diversos tumores tem vindo a ser reportada e associada com um aumento da capacidade de angiogénese, crescimento e invasão tumoral<sup>(57)</sup>. O aumento da produção da proteína pró-angiogénica Bv8 pelas células Gr+CD11b+, processo estimulado pelo G-CSF, provou constituir outro mecanismo de evasão à terapêutica anti-VEGF, uma vez que a inibição conjunta destas moléculas reduziu o crescimento tumoral anteriormente verificado<sup>(6,19,27,57,58)</sup>. Adicionalmente, outro estudo refere que as células Gr+CD11b+ produzem MMP9 (metaloproteinase da matriz 9), a qual exerce um efeito quimiostático sobre os pericitos, sendo as primeiras capazes de se incorporarem no endotélio tumoral *in vivo*<sup>(59)</sup>.

Este mecanismo exemplifica apenas uma fração da complexa rede celular que envolve o recrutamento de células derivadas da medula óssea<sup>(29)</sup>.

### **5.1.3 Os pericítos e o suporte à integridade vascular**

Os pericítos são células perivasculares que possuem longas extremidades aderentes à parede dos vasos sanguíneos, sendo capazes de comunicar com as células endoteliais de forma direta ou através de sinalização parácrina<sup>(3)</sup>. O papel dos pericítos nos processos de estabilização hemodinâmicos e a sua ligação à malignidade tumoral tem vindo a ser reportada ao longo dos anos, estando, contudo, associada a uma relativa heterogeneidade no que diz respeito aos seus marcadores, morfologia e origem<sup>(60)</sup>. Ao contrário do que é frequentemente observado em vasos sanguíneos normais, a presença dos pericítos em ambientes tumorais mostra-se mais escassa e associada a fenótipos anormais (menor ligação às células endoteliais, estruturas morfológicas aberrantes e diferentes marcadores)<sup>(61)</sup>. Na resposta à terapêutica anti-angiogénica, os pericítos são recrutados e promovem a normalização, integridade e estabilidade vascular, sendo também capazes de produzir fatores estimulantes da angiogénese, os quais atuam sobre as células endoteliais e promovem a sua sobrevivência<sup>(28)</sup>. Foi testada a inibição terapêutica conjunta do VEGF e do recrutamento dos pericítos com o objetivo de os dissociar da vasculatura tumoral e aumentar a sensibilização vascular aos agentes anti-angiogénicos. Contudo, a diminuição da cobertura pericítica tornou evidente a diminuição da integridade e espessura vascular e o conseqüente aumento da mobilidade das células tumorais na circulação sistémica. Este processo traduziu-se num efeito metastático aumentado. Face a estes resultados, será necessário um melhor planeamento de forma a avaliar os benefícios clínicos desta estratégia<sup>(28,61)</sup>.

Recentemente, foi possível distinguir duas sub-populações pericíticas: pericítos do tipo 1 e tipo 2. Segundo estudos efetuados, apenas os pericítos de tipo 2 estão envolvidos na angiogénese tumoral, sendo esta descoberta potencialmente fulcral na elaboração de novos inibidores angiogénicos tendo como alvo específico esta sub-população pericítica. O papel dos pericítos do tipo 1 durante o processo tumoral ainda não se encontra totalmente clarificado<sup>(60)</sup>.

### **5.1.4 A ativação e estimulação de um fenótipo tumoral mais invasivo e metastático**

Diversas observações, nomeadamente o crescimento tumoral em períodos isentos de tratamento num regime terapêutico descontinuado com sunitinib<sup>(62)</sup>, sugerem a capacidade tumoral para, mediante a terapêutica anti-angiogénica, promoverem a metastização de outros tecidos e a transição para um fenótipo tumoral mais invasivo e agressivo<sup>(28, 63)</sup>.

## Resistência Tumoral à Terapêutica Anti-angiogénica: Mecanismos de Refratariedade, a Relação Redundante Tumor/Hospedeiro e Perspetivas Futuras

Foi demonstrado que o sunitinib pode acelerar o crescimento metastático e diminuir a sobrevivência de ratos sujeitos a terapia de curta duração em ensaios metastáticos<sup>(62)</sup>. Desta forma, o planeamento do regime terapêutico demonstra ser um passo importante para a eficácia farmacológica. Adicionalmente, outro estudo demonstrou que a adaptação evasiva de tumores sujeitos a terapêutica anti-VEGF resultou no desenvolvimento de frentes de invasão mais amplas, ao passo que os tumores de controlo se mostraram predominantemente encapsulados ou microinvasivos. Para além disso, em modelos Rip1-Tag2 de cancro do pâncreas endócrino, verificou-se que os tumores tratados com o anticorpo anti-VEGF em causa (DC101) possuíam uma cápsula pericítica mais fina, com áreas em que estava quebrada, ou mesmo ausente, associadas a zonas de hipóxia intensa. Este fenótipo mais permeável é propício à metastização celular. Possíveis explicações para tais observações centraram-se no aumento da atividade de programas de invasão pré-existentes que não eram, previamente à terapêutica, a principal força motora do crescimento tumoral, e até na ativação de um programa de invasão distinto do que surge espontaneamente durante o desenvolvimento de um tumor imperturbado<sup>(63)</sup>. A título de exemplo, a osteopontina é referida em diversas publicações e tem sido relacionada com este tipo de resistência.

A osteopontina (OPN), também designada por SPPI, é uma glicofosfoproteína existente em diversos tecidos e fluidos no organismo, com capacidade para se ligar a integrinas (recetores transmembranares) e ao CD44, regulando diversos processos que são importantes na sobrevivência celular<sup>(64, 65)</sup>.

O aumento da concentração de osteopontina em modelos de cancro da mama humano xenográficos foi relacionada com uma promoção da atividade metastática tumoral, inferida a partir da colonização de órgãos mais distantes<sup>(66,67)</sup>. Observações semelhantes foram reportadas em diversos tipos de cancro, relacionando a sobreexpressão desta molécula com um mau prognóstico terapêutico<sup>(68)</sup>. A sua presença no microambiente tumoral foi observada em células tumorais e do estroma, tendo sido também associada a um efeito quimiotático inibidor sobre os TAM's, cuja capacidade apoptótica (efeito citotóxico do NO) sobre as células tumorais foi, por conseguinte, diminuída<sup>(69,70)</sup>. A ativação e mobilização de células derivadas da medula óssea<sup>(71)</sup>, a formação de calcificações em cancros da mama<sup>(72)</sup> e a atividade angiogénica em paralelo com o VEGF<sup>(73)</sup> e o FGF<sup>(74)</sup>, foram também relacionadas com a atividade da osteopontina em modelos de estudo.

### **5.1.5 A co-opção vascular**

A resistência à terapêutica anti-angiogénica nem sempre envolve uma resistência adaptativa que culmina com a prevalência da angiogénese. Alguns tumores possuem a capacidade de prosseguir o seu desenvolvimento através da co-opção vascular, processo no qual as células tumorais migram ao longo dos vasos sanguíneos do hospedeiro, apropriando-se destes e da sua vertente nutritiva e oxidativa, sem que haja brotamento de novos vasos. Por este motivo, a prevalência deste tipo de mecanismo é maior em tumores residentes em ambientes mais vascularizados, como o cérebro, pulmão e fígado, embora tenha sido detectado em diversos tipos de cancro<sup>(21, 29, 75)</sup>.

Adicionalmente, é possível que existam tumores que ostentam fenótipos “mistos”, isto é, com propriedades angiogénicas (na zona “central” do tumor, mais madura) e co-optimativas vasculares (nas extremidades em desenvolvimento). Desta forma, é expectável que as terapêuticas anti-angiogénicas instituídas neste tipo de tumores não tenham o efeito desejável, dada a capacidade das células tumorais de se apropriarem de vasos sanguíneos pré-existent<sup>(75)</sup>. Nestes casos, possíveis combinações terapêuticas que abranjam os dois mecanismos podem ser mais eficazes.

Contudo, outro tipo de mecanismos relacionados com a co-opção vascular podem estar na base do desenvolvimento de resistências à terapêutica anti-angiogénica. A mimetização vascular é um processo na qual as células tumorais fazem uso da sua plasticidade e formam, elas mesmas, estruturas tubulares semelhantes a vasos sanguíneos. Também a intussuscepção, na qual um vaso sanguíneo pré-existente se divide para originar dois vasos “filhos”, possui um papel importante<sup>(22, 75)</sup>.

## **5.2 Resistência intrínseca**

### **5.2.1 Polimorfismos e diferente grau de expressão das isoformas do VEGF**

As isoformas do VEGF (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>) expressas no ambiente tumoral exercem influência sobre a resistência intrínseca prévia à terapêutica anti-VEGF. A título de exemplo, foi reportada a existência de isoformas com o formato VEGF<sub>xxx</sub>, com potencial angiogénico, e VEGF<sub>xxxb</sub>, com características anti-angiogénicas. Contudo, as isoformas VEGF<sub>xxxb</sub> aparentam ter capacidade para se ligarem ao bevacizumab, cuja união diminui os níveis circulatórios de ambos e reduz a eficácia terapêutica. Curiosamente, a baixa expressão desta isoforma, detetada em tumores de cancro colo-rectal metastático, aumentou a disponibilidade do bevacizumab como ligando do VEGF-A e, conseqüentemente,

produziu um cenário clínico mais promissor. O  $ratio\ VEGF_{xxx}/VEGF_{total}$  poderá funcionar como um possível biomarcador preditivo da resposta terapêutica<sup>(76,77)</sup>. Adicionalmente, outro estudo testou o efeito de um inibidor dos receptores tirosina cinase (SU5416) sobre tumores (fibrossarcoma) que expressavam apenas a isoforma VEGF<sub>120</sub> ou VEGF<sub>188</sub> (em ratos). A expressão preferencial da isoforma VEGF<sub>120</sub>, associada a fragilidade vascular e hemorragia, fez com que o tumor ficasse particularmente vulnerável à ação de normalização vascular induzida pelo SU5416. Consequentemente, esta ação tornou o tumor mais resistente a uma posterior intervenção de um agente disruptor vascular<sup>(78)</sup>. O potencial metastático da isoforma VEGF<sub>189</sub> e a sobrevivência/proliferação associada às isoformas VEGF<sub>120</sub> e VEGF<sub>164</sub> (em murganhos), reforçam as características distintas das diferentes isoformas<sup>(79)</sup>. Assim, a quantificação da expressão destas pode funcionar como um importante biomarcador terapêutico.

Similarmente, os polimorfismos genéticos do VEGF, que são expressos num contexto prévio à terapêutica, podem intervir no processo tumoral. A ocorrência de SNPs (polimorfismos de nucleótido único), mais concretamente do SNP rs9582036, foi associada a uma diminuição da sobrevida livre de progressão (PFS) em grupos de doentes portadores de cancro pancreático metastático (estudo “AVITA”) e cancro colo-rectal metastático (estudo “AVOREN”). Por outro lado, o genótipo VEGF-2578 AA foi associado a um benefício na sobrevida global (OS) e a uma menor toxicidade, em doentes portadores de cancro da mama metastático sujeitos a terapêutica de paclitaxel associada, ou não, ao bevacizumab (ensaio E2100 – fase III)<sup>(80)</sup>.

### **5.2.2 A redundância de fatores pró-angiogénicos num contexto prévio à terapêutica**

Embora o VEGF seja considerado um fator chave na regulação da angiogénese patológica, a expressão preferencial de outros fatores alternativos, previamente à terapêutica, pode ocorrer em diversos tumores. Neste contexto, o VEGF não será o principal fator expresso no microambiente tumoral e, por este motivo, poderá não ser a única força impulsionadora da angiogénese.

Um dos estudos mais citados neste âmbito relata a análise de tumores de cancro da mama em fase avançada, que expressam um repertório diversificado de fatores pró-angiogénicos (como o FGF-2), face a tumores em fases mais iniciais, onde o VEGF é preferencialmente expresso. Em ambos os casos, os tumores seriam posteriormente sujeitos à ação do bevacizumab (inibidor do VEGF). No caso dos cancros em fase avançada, os dados

sugerem a possibilidade de uma resistência intrínseca pré-existente ao agente farmacológico referido, que resulta do facto de se pretender neutralizar uma molécula que não é, no ambiente analisado, a única força impulsionadora do desenvolvimento tumoral, mas apenas uma fração do repertório redundante de fatores disponíveis. Desta forma, será de esperar que a angiogénese tumoral persista, mesmo na presença do bevacizumab, sendo suportada pela ação de outros fatores pró-angiogénicos já presentes no meio tumoral<sup>(28)</sup>.

Os doentes portadores de tumores com estas características não tenderão a responder às terapêuticas anti-VEGF, o que levará ao contínuo desenvolvimento tumoral. A obtenção do perfil de expressão destes fatores demonstra ser uma necessidade cada vez mais real, de forma a prever e personalizar regimes terapêuticos mais eficazes<sup>(28)</sup>.

### **5.2.3 A pré-existência de células inflamatórias pró-angiogénicas**

Para além da sua importância nos mecanismos de adaptação após a terapêutica anti-angiogénica, as células inflamatórias pró-angiogénicas podem ser sobreexpressas de forma intrínseca no microambiente tumoral. Este formato de resistência pré-existente condiciona a eficácia dos agentes terapêuticos posteriormente instituídos. Embora exista a possibilidade de que essa resistência possa ser resultado de uma rápida adaptação à terapêutica farmacológica, as observações reportadas apontam para a pré-existência da capacidade de recrutamento destas células em certos tumores<sup>(28)</sup>.

No âmbito de um estudo, foi demonstrado que as células mielóides Gr+CD11b+ podem ser recrutadas para o microambiente tumoral de forma inerente e independente do tratamento, ou seja, a sua ação pode não ser induzida por agentes terapêuticos. A ausência de resposta aos agentes anti-angiogénicos suscitou esta hipótese entre os investigadores, a qual veio a ser confirmada<sup>(28, 81, 82)</sup>.

Será, então, de especular que o recrutamento de células inflamatórias para o microambiente tumoral, por parte das células tumorais, possa conferir uma vantagem intrínseca ao tumor no que diz respeito à resistência aos agentes anti-angiogénicos.

### **5.2.4 A dependência da co-opção vascular no microambiente tumoral**

A angiogénese é um processo fulcral no desenvolvimento tumoral, mas nem todos os tumores dependem necessariamente desta para poderem sobreviver. Determinadas características podem ser ativadas durante o desenvolvimento ontogénico, nomeadamente capacidades fenotípicas mais invasivas e/ou metastáticas, em conjunto com um ambiente

microtumoral adequado, que levam à formação de tumores “não-angiogénicos”. Estes fazem uso da vasculatura circundante do hospedeiro para sobreviverem, sem que haja emissão de estímulos angiogénicos<sup>(83)</sup>. A co-opção vascular pode ser inferida pela extrapolação de resultados obtidos aquando do desenvolvimento de resistências adaptativas à terapêutica anti-angiogénica de certos tumores que, face àqueles que não exercem uma resposta aos agentes farmacológicos, sugerem a pré-existência de mecanismos alternativos<sup>(28)</sup>.

Assim, a ação dos agentes anti-angiogénicos é potencialmente limitada por uma densidade vascular intrinsecamente elevada, associada a tecidos mais vascularizados (fígado, pulmão, cérebro) uma vez que os tumores podem co-optar estes vasos antes de serem sujeitos à terapêutica<sup>(84)</sup>. Um exemplo prático consiste no estudo genético comparativo entre formas angiogénicas e não-angiogénicas de cancro de pulmão de não-pequenas células. Observou-se que os tumores não-angiogénicos, que utilizam a co-opção vascular como abastecimento sanguíneo, possuíam níveis mais elevados de genes codificantes para proteínas envolvidas no metabolismo mitocondrial<sup>(28,83)</sup>. Esta particularidade permitiu uma melhor regulação da cadeia respiratória aos tumores referidos, possivelmente devida à tensão de oxigénio conferida pela proximidade aos vasos sanguíneos do hospedeiro, que suportou o seu crescimento, não tendo sido necessário recorrer a processos angiogénicos<sup>(75)</sup>.

### **5.2.5 A hipovascularidade e a indiferença aos inibidores da angiogénese**

Ao contrário de tumores que exercem uma resistência à terapêutica anti-angiogénica pela capacidade de co-opção de vasos pré-existentes num ambiente de elevada densidade vascular, outros podem proliferar num ambiente com características de baixa densidade vascular, originando tumores inerentemente hipovascularizados<sup>(28)</sup>.

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) encontra-se neste grupo, tendo sido observadas instâncias em que este se encontra associado a um estroma desmoplástico essencialmente avascular, que lhe confere um aspeto geral hipovascularizado. A indiferença perante os inibidores angiogénicos que este apresenta, nomeadamente face ao bevacizumab, pode resultar de mutações no gene supressor de tumores *TP53*, verificado em 75% dos PDAC's<sup>(28)</sup>. A perda da função deste gene resulta numa capacidade tumoral adicional na sobrevivência em condições de hipóxia, nomeadamente naquelas que são induzidas por agentes anti-angiogénicos<sup>(85)</sup>. Adicionalmente, 75% dos PDAC's expressam HIF-1 $\alpha$  constitutivamente, que se relaciona com o aumento de produção do transportador de glicose I e da aldolase-A (intervenientes no metabolismo anaeróbico). A combinação da

perda do gene *TP53* e da utilização de *pathways* metabólicos favoráveis poderão estar na base da formação e sobrevivência deste tipo de tumores<sup>(19)</sup>. Durante o seu desenvolvimento, é expectável que tenha existido uma adaptação progressiva às condições de hipoxia e avascularidade que os rodeiam, a qual lhes conferiu uma vantagem intrínseca na resposta à terapêutica anti-angiogénica<sup>(28)</sup>.

É de realçar que a prevalência deste tipo de resistência poderá ser aplicável a outros tipos de tumores<sup>(28)</sup>.

## **6 A terapêutica anti-angiogénica: perspetivas atuais e futuras**

A discriminação de diferentes mecanismos de resistência à terapêutica anti-angiogénica veio consolidar a necessidade e a atratividade da inibição simultânea de múltiplas moléculas envolvidas nos processos tumorais.

A relação hospedeiro-estroma incentivou a descoberta de novos fármacos anti-angiogénicos cujo foco se expandiu para além da inibição do VEGF. A sua maioria possui como alvo os diferentes fatores pró-angiogénicos alternativos, como o c-Met, Ang-2, FGF-2, entre outros, alguns dos quais já se encontram aprovados pela FDA (Tabela 1) e outros ainda sob estudos clínicos<sup>(29, 86)</sup>. A título de exemplo, o aflibercept é uma proteína de fusão recombinante cujo mecanismo de ação consiste na capacidade para se ligar ao VEGF-A e ao PlGF. É considerado uma *VEGF-trap* (armadilha do VEGF) e foi desenvolvido de forma a otimizar propriedades farmacocinéticas, mantendo a elevada atividade bloqueadora do VEGF. Atualmente, encontra-se aprovado no tratamento do cancro colo-rectal metastático em combinação com o 5-fluorouracilo<sup>(18)</sup>. A inibição de outras moléculas e mecanismos envolvidos na angiogénese tumoral pode constituir um repertório de alvos terapêuticos viáveis. Por exemplo, a neutralização do HIF-1 $\alpha$ , utilizando o bevacizumab em combinação com o topotecan (inibidor da topoisomerase), reduziu o crescimento de neuroblastomas. De forma semelhante, a inibição do c-Met em glioblastomas que apresentam resistência ao bevacizumab provou reduzir a invasão metastática e a sobrevivência tumoral em condições de hipóxia<sup>(29)</sup>.

Diversos fármacos anti-angiogénicos encontram-se em investigação clínica avançada, dos quais são exemplos, bem como os seus alvos e indicações sob estudo: o brivanib (inibe o VEGFR-2 e FGFR-1 – carcinoma hepatocelular), o cediranib (inibe o VEGFR-1 a -3, PDGFR- $\alpha$  e - $\beta$ , FGFR-1, c-KIT – cancro colorectal metastático, glioblastoma recorrente, cancro do ovário, cancro do pulmão de não-pequenas células avançado), o dovitinib (inibe o VEGFR-1 a -3, PDGFR- $\beta$  – tumores sólidos), lenvatinib (inibe o VEGFR-1 a -3, FGFR-1, PDGFR- $\alpha$  e - $\beta$  –

Resistência Tumoral à Terapêutica Anti-angiogénica: Mecanismos de Refratariedade, a Relação Redundante Tumor/Hospedeiro e Perspetivas Futuras

cancro da tiróide, carcinoma hepatocelular) e o linifanib (inibe o VEGFR-1 a -3, PDGFR- $\alpha$  e - $\beta$ , FGFR-1, c-KIT, CSF-1R, FLT3 – ensaio clínico de fase III com indicação para o carcinoma hepatocelular terminado por toxicidade e sem melhorias na sobrevida global)<sup>(86)</sup>.

	Composto	Alvo	Indicação
Terapias baseadas em Anticorpos	Bevacizumab (Avastin)	Anticorpo anti-VEGF	Glioblastoma, CC metastático, RCC metastático, alguns cancros NSCL
	Aflibercept (Eylea)	VEGF-trap de domínios de ligação ao VEGF	CC metastático
	Ramucirumab (Cyramza)	Anticorpo monoclonal humano do VEGFR-2	Adenocarcinoma gástrico ou gastro-esofágico avançado
Pequenos Inibidores de moléculas	Axitinib (Inlyta)	VEGFR 1-3, PDGFR- $\beta$ e c-KIT	RCC avançado
	Cabozantinib (Cometriq)	VEGFR-1-3, c-MET	Carcinoma medular da tiróide metastático
	Everolimus (Afinitor)	mTOR	RCC, tumores neuroendócrinos
	Pazopanib (Votrient)	VEGFR-1-3, PDGFR, c-KIT	RCC
	Regorafenib (Stivarga)	VEGFR-1-3, PDGFR- $\beta$ , Tie2	CC metastático
	Sorafenib (Nexavar)	VEGFR-1-3, PDGFR, RAF	Carcinoma hepatocelular, RCC
	Sunitinib (Sutent)	VEGFR-1-3, PDGFR, c-KIT, FLT3, RET, CSF-1R	RCC, tumores neuroendócrinos
	Vandetanib (Caprelsa)	VEGFR-1-3, EGFR, RET	Carcinoma medular da tiróide localmente avançado em doentes não operáveis, ou metastático

Tabela 1: Lista de fármacos anti-angiogénicos aprovados pela FDA (2014). Legenda: CC – cancro colorectal; RCC – carcinoma das células renais; NSCL – cancro do pulmão de não pequenas células; c-KIT – recetor tirosina cinase com afinidade para o fator de células estaminais; mTOR – proteína alvo da rapamicina; FLT3, RAF e RET – enzimas envolvidas na angiogénese; CSF-1R – recetor do fator estimulador de colónias de macrófagos 1. (Adaptado de MCINTYRE, A., HARRIS, A.L., Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality. *EMBO Mol Med*, 7 (2015), 368-379).

Embora a inibição simultânea de diversos fatores pró-angiogénicos possa conferir uma vantagem terapêutica, será previsível que a diversidade de moléculas compensatórias permita, eventualmente, contrabalançar este efeito e provocar um relapso tumoral através de uma resistência adquirida. É, portanto, essencial a obtenção de perfis angiogénicos e metabólicos personalizados, específicos para cada doente, bem como um ajustamento ponderado do regime terapêutico aplicado, de forma a aumentar a eficácia e a diminuir toxicidades relacionadas<sup>(87)</sup>.

## Resistência Tumoral à Terapêutica Anti-angiogénica: Mecanismos de Refratariedade, a Relação Redundante Tumor/Hospedeiro e Perspetivas Futuras

Outras classes de fármacos anti-angiogénicos podem ser referenciados. Os agentes disruptores vasculares (VDA) representam uma classe de agentes anti-angiogénicos que têm como alvo células endoteliais imaturas, rapidamente proliferativas. Através da rutura do citoesqueleto e conseqüente colapso vascular, este grupo de fármacos, da qual é exemplo o zybrestat, foram combinados com o bevacizumab em ensaios pré-clínicos e clínicos. Contudo, demonstraram elevados níveis de toxicidade<sup>(29)</sup>. A inibição do recrutamento de células inflamatórias derivadas da medula óssea diminui a capacidade angiogénica tumoral, tendo já sido desenvolvidos fármacos que têm como alvo o SDF-1, o CXCR-4 e até a Bv8 (através de anticorpos) cujos resultados são promissores. O mesmo é aplicável a agentes que intervêm na ação dos pericítos, TAF's e no desenvolvimento tumoral baseado tanto na co-opção e mimetização vascular, como no aumento das capacidades invasivas e metastáticas tumorais<sup>(87)</sup>.

A descoberta de novos mecanismos de resistência tem vindo a ser relatada, a qual pode constituir uma adição farmacológica ao leque de alvos disponíveis. Podem ser destacados o sequestro lisossomal de fármacos anti-angiogénicos (sensibilidade anti-tumoral reduzida) e as vesículas extracelulares (contêm uma variedade de moléculas, podendo ser enviadas das células tumorais para o estroma e vice-versa). Estudos demonstram que estas vesículas extracelulares podem conter miRNA (micro RNA), os quais têm vindo a ser implicados na regulação da angiogénese. Assim, estas moléculas constituem alvos terapêuticos viáveis, representando uma área de pesquisa farmacológica que já tem vindo a apresentar alguns resultados promissores<sup>(87, 88)</sup>.

A unanimidade da comunidade científica parece recair sobre a necessidade urgente de uma personalização da terapêutica fazendo uso de biomarcadores específicos com valor preditivo fulcral na eficácia farmacológica. Exemplos de biomarcadores sob investigação incluem: biomarcadores circulatórios (ex.: a concentração de ligandos solúveis angiogénicos); biomarcadores genéticos (ex.: SNP); biomarcadores tecidulares (ex.: coloração imunohistoquímica de recetores angiogénicos); biomarcadores fisiológicos (ex.: a hipertensão). Contudo, a reprodutibilidade preditiva destes biomarcadores, em várias indicações, é limitada. Este entrave pode ser contrabalançado pelas tecnologias proteómicas e genómicas, as quais têm potencial para ser a chave na ligação entre o alvo farmacológico e a terapêutica instituída<sup>(86)</sup>. Adicionalmente, a utilização complementar de algoritmos que incorporem múltiplos parâmetros (como o tipo de cancro, a evolução e localização deste, dados genéticos, marcadores em circulação, dados obtidos a partir de técnicas imagiológicas) aparenta ser o caminho lógico a seguir<sup>(89)</sup>. Técnicas imagiológicas e histológicas poderão ser

## Resistência Tumoral à Terapêutica Anti-angiogénica: Mecanismos de Refratariedade, a Relação Redundante Tumor/Hospedeiro e Perspetivas Futuras

ferramentas adicionais neste âmbito. A monitorização e o *feedback* contínuo da terapêutica permitirão adaptar e otimizar regimes farmacológicos futuros, através das conclusões inferidas, não só durante o tratamento de doentes, mas também em ensaios pré-clínicos e clínicos<sup>(87)</sup> (Figura I).

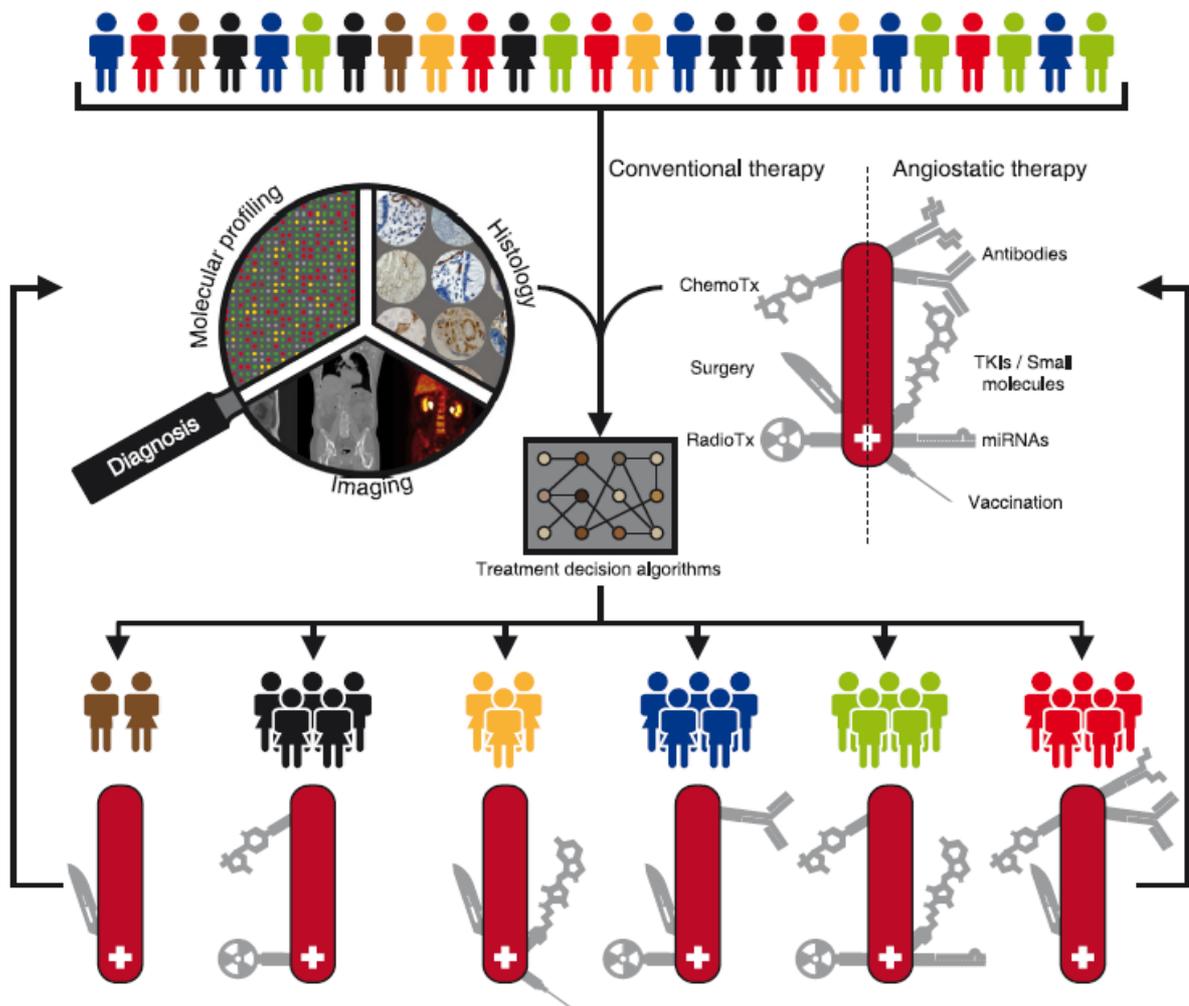


Figura I – Representação esquemática de possíveis combinações terapêuticas a serem aplicadas no futuro, com o objetivo de melhorar a eficácia clínica e a evasão às resistências anti-angiogénicas. A comparação pode ser feita com um canivete suíço, sendo que apenas uma combinação ideal de técnicas cientificamente avançadas e a utilização de algoritmos pré-definidos permitirão estabelecer regimes específicos e propícios para cada subgrupo de doentes. Todo este processo será monitorizado e o *feedback* informativo utilizado num modelo cíclico de melhoria contínua, evitando o surgimento de resistências terapêuticas. Adaptado de VAN BEIJNUM, J.R., NOWAK-SLIWINSKA, P., HUIJBERS, E.J., THIJSEN, V.L., GRIFFIOEN, A.W., The great escape; the hallmarks of resistance to antiangiogenic therapy. *Pharmacol Rev*, 67 (2015), 441-461.

## 7 Conclusão

A angiogénese tumoral como uma via fulcral de subsistência de vários tipos de cancro tem concentrado atenções na comunidade científica. Este alvo terapêutico promissor emergiu com especial influência aquando da identificação do VEGF como um elemento chave deste mecanismo. A inibição da atividade deste fator pró-angiogénico levou ao desenvolvimento de diversos agentes farmacológicos mas, ao contrário do que se antecipava, a emergência de resistências terapêuticas tumorais, adaptativas e intrínsecas, comprometeu a eficácia na prática clínica e consolidou, uma vez mais, a exímia capacidade de sobrevivência destas estruturas. Estudos posteriores e avanços científicos identificaram mecanismos plausíveis que permitem prolongar a sobrevivência tumoral face à terapêutica. Adicionalmente, possibilitaram o desenvolvimento de novos fármacos, alguns já aprovados para uso terapêutico, com vista a inibição dos múltiplos *pathways* e sinalizadores celulares desvendados.

Assim, a potencialidade desta vertente terapêutica ainda é uma realidade. De forma a evitar o aparecimento de resistências e a aumentar a eficácia farmacológica no tratamento do cancro, será essencial apostar na elaboração cuidada de perfis específicos para cada subgrupo de doentes, aliada à aplicação prática de técnicas científicas avançadas com valor preditivo confirmado. A heterogeneidade da resposta aos agentes anti-angiogénicos parece ser um dado adquirido, mas o planeamento personalizado de regimes terapêuticos, inclusivamente em conjunto com outras terapias e mediante cada caso apresentado, está ao alcance da comunidade científica e tem potencial para amenizar essas discrepâncias observadas ao longo destes anos de estudo.

## 8 Bibliografia

1. UNITED STATES. American Cancer Society, **Cancer Facts & Figures 2015**. American Cancer Society, 2015.
2. RIBATTI, D., **Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis**. *Angiogenesis*, 11 (2008), 3-10.
3. BERGERS, G., SONG, S., **The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance**. *Neuro Oncol*, 7 (2005), 452-464.
4. CARMELIET, P., **Angiogenesis in life, disease and medicine**. *Nature*. 438 (2005), 932-936.
5. MARTÍNEZ-EZQUERRO, J.D., HERRERA, L.A., **Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer**. *Cancerología I* (2006), 83-96.
6. WELTI, J., LOGES S., DIMMELER S., CARMELIET P., **Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer**. *J Clin Invest*, 123 (2013), 3190-3200.
7. FOLKMAN, J., **Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?** *Nat Rev Drug Discov*, 6 (2007), 273-286.
8. MOSERLE, L., JIMENEZ-VALERIO, G., CASANOVAS, O., **Antiangiogenic therapies: going beyond their limits**. *Cancer Discov*, 4 (2014), 31-41.
9. SENGER, D.R., GALLI, S.J., DVORAK, A.M., PERRUZZI, C.A., HARVEY, V.S., DVORAK, H.F., **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid**. *Science*, 219 (1983), 983-985.
10. FERRARA, N., **Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress**. *Endocrine reviews*, 25 (2004), 581-611.
11. VITT, U.A., HSU, S.Y., HSUEH, A.J., **Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules**. *Mol Endocrinol*, 15 (2001), 681-694.
12. YAMAZAKI, Y., MATSUNAGA, Y., TOKUNAGA, Y., OBAYASHI, S., SAITO, M., MORITA, T., **Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species**. *J Biol Chem*, 284 (2009), 9885-9891.
13. HOLMES, D.I., ZACHARY I., **The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease**. *Genome Biology*, 6 (2005).
14. DUFFY, A.M., BOUCHIER-HAYES, D.J., HARMEY, J.H., **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF**. *VEGF and Cancer* (2004), 133-144.
15. HOEBEN, A., LANDUYT, B., HIGHLEY, M.S., WILDIERS, H., VAN OOSTEROM, A.T., DE BRUIJN, E.A., **Vascular endothelial growth factor and angiogenesis**. *Pharmacological reviews*, 56 (2004), 549-580.
16. LOS, M., ROODHART, J.M., VOEST, E.E., **Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer**. *Oncologist*, 12 (2007), 443-450.
17. GOTINK, K.J., VERHEUL, H.M., **Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?** *Angiogenesis*, 13 (2010) 1-14.
18. COOK, K.M., FIGG, W.D. **Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects**. *CA Cancer J Clin*, 60 (2010) 222-243.

19. BOTTSFORD-MILLER, J.N., COLEMAN, R.L., SOOD, A.K. **Resistance and escape from antiangiogenesis therapy: clinical implications and future strategies.** *J Clin Oncol*, 30 (2012), 4026-4034.
20. KERBEL, R.S., **Issues regarding improving the impact of antiangiogenic drugs for the treatment of breast cancer.** *Breast*, 18 (2009) S41-S47.
21. GRÉPIN, R., PAGÈS, G., **Molecular Mechanisms of Resistance to Tumour Anti-Angiogenic Strategies.** *Journal of Oncology*, (2010) 1-8.
22. GACCHE, R.N., **Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness.** *Oncogenesis*, 4 (2015), 1-8.
23. GILKES, D.M., SEMENZA, G.L., WIRTZ, D., **Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis.** *Nat Rev Cancer*, 14 (2014.), 430-439.
24. BRANCO-PRICE, C., ZHANG, N., SCHNELLE, M., EVANS, C., KATSCHINSKI, D.M., LIAO, D., ELLIES, L., JOHNSON, R.S., **Endothelial cell HIF-1alpha and HIF-2alpha differentially regulate metastatic success.** *Cancer Cell*, 21 (2012), 52-65.
25. LI, G., SHAN, C., LIU, L., ZHOU, T., ZHOU, J., HU, X., CHEN, Y., CUI, H., GAO, N., **Tanshinone IIA inhibits HIF-1alpha and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway.** *PLoS One*, 10 (2015), 1-14.
26. CASCONI, T., HERYNK, M.H., XU, L., DU, Z., KADARA, H., NILSSON, M.B., OBORN, C.J., PARK, Y.Y., EREZ, B., JACOBY, J.J., LEE, J.S., LIN, H.Y., CIARDIELLO, F., HERBST, R.S., LANGLEY, R.R., HEYMACH, J.V., **Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma.** *J Clin Invest*, 121 (2011), 1313-1328.
27. EBOS, J.M.L., LEE, C.R., KERBEL, R.S., **Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15 (2009), 5020-5025.
28. BERGERS, G., HANAHAHAN, D., **Modes of resistance to anti-angiogenic therapy.** *Nat Rev Cancer*, 8 (2008), 592-603.
29. MCINTYRE, A., HARRIS, A.L., **Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality.** *EMBO Mol Med*, 7 (2015), 368-379.
30. CRAWFORD, Y., KASMAN, I., YU, L., ZHONG, C., WU, X., MODRUSAN, Z., KAMINKER, J., FERRARA, N., **PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment.** *Cancer Cell*, 15 (2009), 21-34.
31. FRANCIA, G., EMMENEGGER, U., KERBEL, R.S., **Tumor-associated fibroblasts as "Trojan Horse" mediators of resistance to anti-VEGF therapy.** *Cancer Cell*, 15 (2009), 3-5.
32. DOI, T., MA, Y., DONTABHAKTUNI, A., NIPPGEN, C., NIPPGEN, J., OHTSU, A., **Phase I study of olaratumab in Japanese patients with advanced solid tumors.** *Cancer Sci*, 105 (2014), 862-869.
33. DI TOMASO, E., LONDON, N., FUJA, D., LOGIE, J., TYRRELL, J.A., KAMOUN, W., MUNN, L.L., JAIN, R.K., **PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment.** *PLoS One*, 4 (2009), e5123 1-8.
34. HELDIN, C.H., WESTERMARK, B., **Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor.** *Physiol Rev*, 79 (1999), 1283-1316.
35. LI, X., PONTÉN, A., AASE, K., KARLSSON, L., ABRAMSSON, A., UUTELA, M., BÄCKSTRÖM, G., HELLSTRÖM, M., BOSTRÖM, H., LI, H., SORIANO, P., BETSHOLTZ,

- C., HELDIN, C.H., ALITALO, K., OSTMAN, A., ERIKSSON, U., **PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor.** *Nat Cell Biol*, 2 (2000), 302-309.
36. RUFFINI, F., TENTORI, L., DORIO, A.S., ARCELLI, D., D'AMATI, G., D'ATRI, S., GRAZIANI, G., LACAL, P.M., **Platelet-derived growth factor C and calpain-3 are modulators of human melanoma cell invasiveness.** *Oncol Rep*, 30 (2013), 2887-2896.
37. HARA, Y., YAMASHITA, T., OISHI, N., NIO, K., HAYASHI, T., NOMURA, Y., YOSHIDA, M., HAYASHI, T., HASHIBA, T., ASAHINA, Y., KONDO, M., OKADA, H., SUNAGOZAKA, H., HONDA, M., KANEKO, S., **Tsu-68 ameliorates hepatocellular carcinoma growth by inhibiting microenvironmental platelet-derived growth factor signaling.** *Anticancer Res*, 35 (2015), 1423-1431.
38. DAMYANOV, D., KOYNOV, K., NASEVA, E., BICHEV, S., **EGFR mutations in patients with non small-cell lung cancer in Bulgaria and treatment with gefitinib.** *J BUON*, 20 (2015), 136-141.
39. NGUYEN, K.S., KOBAYASHI, S., COSTA, D.B., **Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway.** *Clin Lung Cancer*, 10 (2009), 281-289.
40. GAZDAR, A.F., **Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors.** *Oncogene*, 28 (2009), S24-S31.
41. PUBMED. **EGFR epidermal growth factor receptor [ Homo sapiens (human) ]**. 05-07-2015 [23-07-2015]; Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956>.
42. CASANOVAS, O., **The adaptive stroma joining the antiangiogenic resistance front.** *J Clin Invest*, 121 (2011), 1244-1247.
43. Hecht, J.R., Mitchell, E., Chidiac, T., Scroggin, C., Hagenstad, C., Spigel, D., Marshall, J., Cohn, A., McCollum, D., Stella, P., Deeter, R., Shahin, S., Amado, R.G., **A randomized phase III B trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer.** *J Clin Oncol*, 27 (2009), 672-680.
44. CASANOVAS, O., HICKLIN, D.J., BERGERS, G., HANAHAN, D., **Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors.** *Cancer Cell*, 8 (2005), 299-309.
45. FAGIANI, E., CHRISTOFORI, G., **Angiopoietins in angiogenesis.** *Cancer Lett*, 328 (2013), 18-26.
46. THOMAS, M., AUGUSTIN, H.G., **The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis.** *Angiogenesis*, 12 (2009), 125-137.
47. LEWIS, C.E., DE PALMA, M., NALDINI, L., **Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2.** *Cancer Res*, 67 (2007), 8429-8432.
48. SHOJAEI, F., LEE, J.H., SIMMONS, B.H., WONG, A., ESPARZA, C.O., PLUMLEE, P.A., FENG, J., STEWART, A.E., HU-LOWE, D.D., CHRISTENSEN, J.G., **HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors.** *Cancer Res*, 70 (2010), 10090-10100.
49. KNUDSEN, B.S., WOUDE, G.V., **Showering c-MET-dependent cancers with drugs.** *Curr Opin Genet Dev*, 18 (2008), 87-96.
50. JAHANGIRI, A., DE LAY, M., MILLER, L.M., CARBONELL, W.S., HU, Y.L., LU, K., TOM, M.W., PAQUETTE, J., TOKUYASU, T.A., TSAO, S., MARSHALL, R., PERRY, A., BJORGAN,

- K.M., CHAUMEIL, M.M., RONEN, S.M., BERGERS, G., AGHI, M.K., **Gene expression profile identifies tyrosine kinase c-Met as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance.** Clin Cancer Res, 19 (2013), 1773-1783.
51. AGHI, M., COHEN, K.S., KLEIN, R.J., SCADDEN, D.T., CHIOCCA, E.A., **Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes.** Cancer Res, 66 (2006), 9054-9064.
52. YAMAGUCHI, J., KUSANO, K.F., MASUO, O., KAWAMOTO, A., SILVER, M., MURASAWA, S., BOSCH-MARCE, M., MASUDA, H., LOSORDO, D.W., ISNER, J.M., ASAHARA, T., **Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.** Circulation, 107 (2003), 1322-1328.
53. D'APUZZO, M., ROLINK, A., LOETSCHER, M., HOXIE, J.A., CLARK-LEWIS, I., MELCHERS, F., BAGGIOLINI, M., MOSER, B., **The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4.** Eur J Immunol, 27 (1997), 1788-1793.
54. KRYCZEK, I., WEI, S., KELLER, E., LIU, R., ZOU, W., **Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis.** Am J Physiol Cell, 292 (2007), C987-C995.
55. PUBMED. **PROK2 prokineticin 2 [ Homo sapiens (human) ].** 4-07-2015 [23-07-2015]. Disponível na internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/60675>
56. SHOJAEI, F., WU, X., ZHONG, C., YU, L., LIANG, X.H., YAO, J., BLANCHARD, D., BAIS, C., PEALE, F.V., VAN BRUGGEN, N., HO, C., ROSS, J., TAN, M., CARANO, R.A., MENG, Y.G., FERRARA, N., **Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis.** Nature, 450 (2007), 825-831.
57. CRAWFORD, Y., FERRARA, N., **Tumor and stromal pathways mediating refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies.** Trends Pharmacol Sci, 30 (2009). 624-630.
58. SHOJAEI, F., WU, X., QU, X., KOWANETZ, M., YU, L., TAN, M., MENG, Y.G., FERRARA, N., **G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models.** Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (2009), 6742-6747.
59. YANG, L., DEBUSK, L.M., FUKUDA, K., FINGLETON, B., GREEN-JARVIS, B., SHYR, Y., MATRISIAN, L.M., CARBONE, D.P., LIN, P.C., **Expansion of myeloid immune suppressor Gr<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis.** Cancer Cell, 6 (2004.), 409-421.
60. Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z., Messi, M.L., Olson, J.D., Mintz, A., Delbono, O., **Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis.** Am J Physiol Cell, 307 (2014), C25-C38.
61. XIAN, X., HÅKANSSON, J., STÅHLBERG, A., LINDBLOM, P., BETSHOLTZ, C., GERHARDT, H., SEMB, H., **Pericytes limit tumor cell metastasis.** J Clin Invest, 116 (2006), 642-651.
62. EBOS, J.M., LEE, C.R., CRUZ-MUNOZ, W., BJARNASON, G.A., CHRISTENSEN, J.G., KERBEL, R.S., **Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis.** Cancer Cell, 15 (2009), 232-239.
63. PAEZ-RIBES, M., ALLEN, E., HUDOCK, J., TAKEDA, T., OKUYAMA, H., VIÑALS, F., INOUE, M., BERGERS, G., HANAHAN, D., CASANOVAS, O., **Antiangiogenic therapy**

- elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis.** *Cancer Cell*, 15 (2009), 220-231.
64. PUBMED. **SPPI secreted phosphoprotein 1 [ Homo sapiens (human) ]**.5-07-2015 [24-07-2015]; Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6696>.
65. ANBORGH, P.H., MUTRIE, J.C., TUCK, A.B., CHAMBERS, A.F., **Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumour microenvironment.** *J Cell Mol Med*, 14 (2010), 2037-2044.
66. SUZUKI, M., MOSE, E., GALLOY, C., TARIN, D., **Osteopontin Gene Expression Determines Spontaneous Metastatic Performance of Orthotopic Human Breast Cancer Xenografts.** *The American Journal of Pathology*, 171(2007), 682-692.
67. EBOS, J.M., LEE, C.R., CHRISTENSEN, J.G., MUTSAERS, A.J., KERBEL, R.S., **Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (2007), 17069-17074.
68. RAMCHANDANI, D., WEBER, G.F., **Interactions between osteopontin and vascular endothelial growth factor: Implications for cancer.** *Biochim Biophys Acta*, 1855 (2015), 202-222.
69. WAI, P.Y., GUO, L., GAO, C., MI, Z., GUO, H., KUO, P.C., **Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation.** *Surgery*, 140 (2006.), 132-140.
70. FENG, B., ROLLO, E.E., DENHARDT, D.T., **Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity: evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme.** *Clin Exp Metastasis*, 13 (1995), 453-462.
71. MCALLISTER, S.S., GIFFORD, A.M., GREINER, A.L., KELLEHER, S.P., SAELZLER, M.P., INCE, T.A., REINHARDT, F., HARRIS, L.N., HYLANDER, B.L., REPASKY, E.A., WEINBERG, R.A., **Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin.** *Cell*, 133 (2008), 994-1005.
72. BELLAHCENE, A., CASTRONOVO, V., **Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer.** *Am J Pathol*, 146 (1995), 95-100.
73. DAI, J., PENG, L., FAN, K., WANG, H., WEI, R., JI, G., CAI, J., LU, B., LI, B., ZHANG, D., KANG, Y., TAN, M., QIAN, W., GUO, Y., **Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells.** *Oncogene*, 28 (2009), 3412-3422.
74. LEALI, D., DELL'ERA, P., STABILE, H., SENNINO, B., CHAMBERS, A.F., NALDINI, A., SOZZANI, S., NICO, B., RIBATTI, D., PRESTA, M., **Osteopontin (Eta-I) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis.** *J Immunol*, 171 (2003), 1085-1093.
75. DONNEM, T., HU J., FERGUSON, M., ADIGHIBE, O., SNELL, C., HARRIS, A.L., GATTER, K.C., PEZZELLA, F., **Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment?** *Cancer Med*, 2 (2013), 427-436.
76. BATES, D.O., CATALANO, P.J., SYMONDS, K.E., VAREY, A.H., RAMANI, P., O'DWYER, P.J., GIANTONIO, B.J., MEROPOL, N.J., BENSON, A.B., HARPER, S.J., **Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab.** *Clin Cancer Res*, 18 (2012), 6384-6391.

77. HARRIS, S., CRAZE, M., NEWTON, J., FISHER, M., SHIMA, D.T., TOZER, G.M., KANTHOU, C., **Do anti-angiogenic VEGF (VEGFxxx) isoforms exist? A cautionary tale.** PLoS One, 7 (2012), 1-14.
78. AKERMAN, S., FISHER, M., DANIEL, R.A., LEFLEY, D., REYES-ALDASORO, C.C., LUNT, S.J., HARRIS, S., BJORND AHL, M., WILLIAMS, L.J., EVANS, H., BARBER, P.R., PRISE, V.E., VOJNOVIC, B., KANTHOU, C., TOZER, G.M., **Influence of soluble or matrix-bound isoforms of vascular endothelial growth factor-A on tumor response to vascular-targeted strategies.** Int J Cancer, 133 (2013), 2563-2576.
79. KANTHOU, C., DACHS, G.U., LEFLEY, D.V., STEELE, A.J., CORALLI-FOXON, C., HARRIS, S., GRECO, O., DOS SANTOS, S.A., REYES-ALDASORO, C.C., ENGLISH, W.R., TOZER, G.M., **Tumour cells expressing single VEGF isoforms display distinct growth, survival and migration characteristics.** PLoS One, 9 (2014), 1-13.
80. CLARKE, J.M., HURWITZ, H.I., **Understanding and targeting resistance to anti-angiogenic therapies.** Journal of Gastrointestinal Oncology, 4 (2013), 253-263.
81. SHOJAEI, F., WU, X., MALIK, A.K., ZHONG, C., BALDWIN, M.E., SCHANZ, S., FUH, G., GERBER, H.P., FERRARA, N., **Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells.** Nat Biotechnol, 25 (2007), 911-920.
82. ELLIS, L.M., HICKLIN, D.J., **Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy.** Clin Cancer Res, 14 (2008) 6371-6375.
83. HU, J., BIANCHI, F., FERGUSON, M., CESARIO, A., MARGARITORA, S., GRANONE, P., GOLDSTRAW, P., TETLOW, M., RATCLIFFE, C., NICHOLSON, A.G., HARRIS, A., GATTER, K., PEZZELLA, F., **Gene expression signature for angiogenic and nonangiogenic non-small-cell lung cancer.** Oncogene, 24 (2005), 1212-1219.
84. LEENDERS, W.P., KÜSTERS, B., VERRIJP, K., MAASS, C., WESSELING, P., HEERSCHAP, A., RUITER, D., RYAN, A., DE WAAL, R., **Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option.** Clin Cancer Res, 10 (2004), 6222-6230.
85. YU, J.L., RAK, J.W., COOMBER, B.L., HICKLIN, D.J., KERBEL, R.S., **Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy.** Science, 295(2002) 1526-1528.
86. ZHAO, Y., ADJEI, A.A., **Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor.** Oncologist, 20 (2015), 660-673.
87. VAN BEIJNUM, J.R., NOWAK-SLIWINSKA, P., HUIJBERS, E.J., THIJSSSEN, V.L., GRIFFIOEN, A.W., **The great escape; the hallmarks of resistance to antiangiogenic therapy.** Pharmacol Rev, 67 (2015), 441-461.
88. ANAND, S., **A brief primer on microRNAs and their roles in angiogenesis.** Vascular Cell, 5 (2013), 1-7.
89. VASUDEV, N.S., REYNOLDS, A.R., **Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions.** Angiogenesis, 17 (2014), 471-494.