



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

AFONSO MANUEL FREITAS DE AGUIAR

Sistema Imunitário, Inflamação e Cancro do Pâncreas

ARTIGO DE REVISÃO NARRATIVA

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO

PROFESSOR DOUTOR RUI VASCO QUINTAIS GRADIZ

ABRIL/2021

SISTEMA IMUNITÁRIO, INFLAMAÇÃO E CANCRO DO PÂNCREAS
IMMUNE SYSTEM, INFLAMMATION AND PANCREATIC CANCER

Afonso Manuel Freitas de Aguiar¹; Professora Doutora Anabela Mota Pinto²; Professor Doutor Rui Vasco Quintas Gradiz^{2*}

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

²Instituto de Patologia Geral, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

*Autor correspondente:

Instituto de Patologia Geral, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Rua Larga, 3004-504 Coimbra, Portugal Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

rgradiz@fmed.uc.pt

ÍNDICE

RESUMO	1
INTRODUÇÃO	8
MATERIAIS E MÉTODOS	9
DISCUSSÃO	10
1. Adenocarcinoma Ductal do Pâncreas	10
2. Sistema Imunitário	13
2.1 Sistema inato	13
2.2 Sistema adaptativo	15
3 Imunoterapia	17
4 Sistema Imunitário e Cancro do pâncreas	18
4.1 Microambiente Tumoral:	18
4.1.1 Principais Intervenientes	20
4.1.1.1 Fibroblastos Associados ao tumor e Células Estreladas Pancreáticas	20
4.1.1.2 Linfócitos T reguladores e MDSCs	23
4.1.1.3 Monócitos e Macrófagos Associados ao Tumor	26
4.1.1.4 Neutrófilos Associados ao Tumor:	28
4.1.1.5 Células Dendríticas:	30
CONCLUSÕES	31
AGRADECIMENTOS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

O adenocarcinoma ductal do pâncreas é uma neoplasia com um prognóstico reservado, apresentando uma taxa média de sobrevivência global de todos os seus estádios combinados aos 5 anos de cerca de 9%. Aquando do diagnóstico, mais de metade dos pacientes têm metástases. A cirurgia é o único tratamento com potencial curativo, contudo a maioria dos casos recorre nos dois primeiros anos. Nos últimos anos, tem existido um interesse crescente por parte da comunidade científica no estudo do microambiente tumoral desta neoplasia. De acordo com a literatura revista, acredita-se que este microambiente desempenhe um papel importante no seu desenvolvimento.

Neste artigo de revisão propusemo-nos sumariar e evidenciar o impacto da reação imune e inflamatória, que constitui este microambiente, na fisiopatologia do adenocarcinoma ductal do pâncreas e a sua relação com a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos, tendo-se destacado os principais intervenientes da relação entre o microambiente tumoral e as células neoplásicas e respetivas principais lesões precursoras.

Para este fim, foi realizada uma pesquisa nas bases de dados bibliográficas Elsevier/ScienceDirect, Clinicaltrials.gov e PubMed, e analisadas as publicações dos últimos doze anos, de 2009 a 2021, na tipologia de artigos de revisão, meta-análises, artigos de investigação, artigos científicos e ensaios clínicos, relativos ao objetivo.

Neste artigo, verificámos que o microambiente tumoral desempenha um papel importante no desenvolvimento do PDAC, tratando-se de um microambiente rico e amplamente diversificado na sua constituição celular e estromal. Contudo, verificou-se que este é uma entidade extremamente heterogénea e complexa. Por este motivo, efetuou-se uma interligação de resultados de diversos ensaios pré-clínicos, de modo a permitir uma perceção generalista dos diferentes grupos celulares que constituem este microambiente e identificar possíveis sinergias. Neste sentido, abordámos o papel dos CAFs, Tregs, MDSCs, TAMs, TANs e CDs e respetivos possíveis novos alvos terapêuticos. Realçámos a importância dos padrões de resposta imunes Th1, Th2 e Th17 no próprio TME e, salientámos também o papel contínuo da IL-6 e IL-8 no TME.

Concluimos que é importante ter uma visão ampla da “arquitetura” e “organização” deste microambiente, visto que a imunomodulação específica de um determinado grupo celular não só tem impacto na relação do TME com a neoplasia, como também poderá desencadear uma resposta compensatória indesejável que, quando detetada, poderá ser revertida, através da utilização e associação de diferentes imunoterapias. Por conseguinte, sublinhamos a possibilidade de existir um largo benefício entre a associação das imunoterapias que têm como alvo o TME. Terminámos inferindo que este possível benefício, associado ao facto destas novas terapias terem demonstrado um grande potencial efeito sinérgico com a quimiorradioterapia vigente e ainda associado à possibilidade de sensibilizarem o tumor para a imunoterapia baseada em checkpoints, poderá mudar o paradigma atual que representa o adenocarcinoma ductal do pâncreas.

Palavras-chave: neoplasias pancreáticas; inflamação; sistema Imunitário;

ABSTRACT

Ductal adenocarcinoma of the pancreas is a neoplasm with a poor prognosis. The average overall survival rate for all its combined stadiums at 5 years is around 9%. At diagnosis, more than half of patients have metastases. Surgery is the only treatment with a curative potential, but most cases recur in the first two years. In recent years there has been a growing interest on the part of the scientific community in the study of the tumor microenvironment of this neoplasm. It is believed that this microenvironment plays an important role in its development.

In this review article we set out to summarize and highlight the impact of the immune and inflammatory reaction, which constitutes this microenvironment, on the pathophysiology of pancreatic ductal adenocarcinoma and its relationship with the identification of possible new therapeutic targets, with the main players highlighted the relationship between the tumor microenvironment and the neoplastic cells and their main precursor lesions.

For this purpose, a search was performed in the bibliographic databases Elsevier / ScienceDirect, PubMed and Clinicaltrials.gov, and the publications of the last twelve years, from 2009 to 2021, were analyzed, in the typology of review articles, meta-analyzes, research articles, scientific articles and clinical trials, related to the objective.

In this article, we found that the tumor microenvironment plays an important role in the development of PDAC, as it is a rich and widely diversified microenvironment in its cellular and stromal constitution. However, it was found that this is an extremely heterogeneous and complex entity. For this reason, the results of several pre-clinical trials were crossed, to allow a general perception of the different cell groups that make up this microenvironment and to identify possible synergies. In this sense, we addressed the role of CAFs, Tregs, MDSCs, TAMs, TANs and CD8 and their possible new therapeutic targets. We highlighted the importance of Th1, Th2 and Th17 immune response patterns in the TME itself. We also stressed the continued role of IL-6 and IL-8 in TME.

We conclude that it is important to have a broad view of the “architecture” and “organization” of this microenvironment, since the specific immunomodulation of a given cell group not only impacts the relationship of the TME with the neoplasm, but may also trigger an undesirable compensatory response that , when detected, can be reversed, through the use and association of different immunotherapies. Therefore, we underline the possibility that there is a wide benefit between the combination of immunotherapies that target TME. We ended by inferring that this possible benefit, associated with the fact that these new therapies have demonstrated a great potential synergistic effect with the current chemoradiotherapy and also associated with the possibility of sensitizing the tumor to checkpoint-based immunotherapy, may change the current paradigm that represents ductal adenocarcinoma of the pancreas.

Keywords: *pancreatic neoplasms; inflammation; immune system;*

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ACT - Transferência adotiva de células / *Adoptive cell transfer*

ADM - Metaplasia acinar-para-ductal / *Acinar-to-ductal metaplasia*)

APCs - Células apresentadoras de antígenos / *Antigen-presenting cells*)

CAFs - Fibroblastos Associados ao tumor / *Cancer-associated fibroblast*

CD - *Cluster* de diferenciação / *Clusters of differentiation*

CDs - Células dendríticas / *Dendritic cells*

CP - Cancro do pâncreas / *Pancreatic cancer*

CSF - Fator de estimulação de colónias / *Colony-stimulating factor*

CTLA4 - Antígeno 4 do linfócito T citotóxico / *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*

CXC - *Motif chemokine*

DCR - Taxa de controlo de doença / *Disease control rate*

ECM - Matriz extracelular / *Extracellular matrix*

FAK - Cinase focal de adesão / *Focal Adhesion Kinase*

FGF-2 - Fator de crescimento de fibroblastos / *Fibroblast Growth Factor 2*

FOLFIRINOX - Regime de quimioterapia com ácido folínico, 5-fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina / *Chemotherapy regimen with fluorouracil, irinotecan and folinic acid*

FOXP3 - *Forkhead box P3*

G-CSF - Fator de estimulação de colónias de granulócitos

GEMM - Modelos de ratos geneticamente projetados/ *Genetically engineered mouse models*

GM-CSF - Fator de estimulação de colónias de granulócitos e macrófagos

iCAFs - CAFs inflamatórios / *Inflammatory CAFs*

ICIs - Inibidores de *checkpoints* imunes / *Immune checkpoint inhibitors*

IL - Interleucina / *Interleukin*

IMC - Índice de massa corporal / *Body mass index*

INF- γ - Interferão-gama / *Interferon gamma*

IPMN - Neoplasias mucinosas papilares intraductais / *Intraductal papillary mucinous neoplasm*

IRAK4 - Cinase 4 associada ao recetor de interleucina 1 / *Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*

JAK/STAT - família de tirosina cinases JAK - *Janus-activated kinase* / Fatores de transcrição da família STAT

LIF - Fator inibidor de leucemia / *Leukemia inhibitory factor*

LPS – Lipopolissacarídeo / *Lipopolysaccharide*

MCN - Neoplasias císticas mucinosas / *Mucinous cystic neoplasms*

M-CSF - Fator de estimulação de colónias de macrófagos / *Macrophage colony-stimulating factor*

MDSCs - Células supressoras derivadas de mielóide / *Myeloid-derived suppressor cells*

MeSH - *Medical Subject Headings*

MHC - Complexo maior de histocompatibilidade / *Major histocompatibility complex*

MMP - Metaloproteinases da matriz / *Matrix metalloproteinases*

MyCAFs - CAFs miofibroblásticos / *Myofibroblastic CAFs*

NAPOLI-1- Regime de quimioterapia com ácido folínico, fluorouracil e nanoliposomal irotecano / *Nanoliposomal irinotecan, fluorouracil and folinic acid*

NCAM – Molécula de adesão celular neuronal / *Neural cell adhesion molecule*

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

NE - Elastase neutrofílica / *Neutrophil elastase*

NG2 - Antígeno 2 neuronal/glião / *Neural/glioma antigen 2*

NK – Células *natural killer* / *Natural killer cells*

OS - Taxa de sobrevivência global / *Overall survival*

PanINs – Neoplasias intraepiteliais pancreáticas / *Pancreatic intraepithelial neoplasia*

PC – Pancreatite crónica / *Chronic pancreatitis*

pCAFs – Fibroblastos associados ao tumor a favor da progressão tumoral / *Cancer promoting cancer-associated fibroblast*

PD-1- Proteína de morte celular programada 1 / *Programmed cell death 1*

PDAC - Adenocarcinoma ductal do pâncreas / *Pancreatic ductal adenocarcinoma*

PD-L1 - Ligando da proteína de morte celular programada 1 / *Programmed cell death ligand 1*

PD-L2 - Ligando da proteína de morte celular programada 2 / *Programmed cell death ligand 2*

PMNs - Células polimorfonucleares / *Polymorphonuclear cells*

PR - Resposta parcial / *Partial response*

PSCs - Células pancreáticas estreladas / *Pancreatic stellate cells*

rCAFs - Fibroblastos associados ao tumor que restringem progressão tumoral / *Cancer-restraining CAFs*

ROS - Espécies reativas de oxigênio / *Reactive oxygen species*

RT - Radioterapia / *Radiotherapy*

SD - Doença estável / *Stable disease*

SDF-1 - Fator derivado de células estromais 1 / *Stromal cell derived factor 1*

Shh - *Sonic hedgehog*

SMA- α - Actina do músculo liso alfa / *Alpha smooth muscle actin*

TAA - Antígenos associados ao tumor / *Tumor associated antigens*

TCRs - Receptor de células T / *T-cell receptors*

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta / *Transforming growth factor beta*

Th - *Helper inducer T-lymphocytes*

TLR - Recetores do tipo Toll / *Toll-like receptors*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa / *Tumor necrosis factor alpha*

Treg - Células T reguladores / *Regulatory T-lymphocytes*

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular / *Vascular endothelial growth factor*

WHO - *Organização Mundial da Saúde / World's Health Organization*

ZA - Ácido zoledrónico / *zoledronic acid*

INTRODUÇÃO

O cancro do pâncreas, em 2020, representou a quarta causa principal de morte por neoplasias nos Estados Unidos. (1) Estima-se que, em 2030, venha a constituir a 2ª causa de morte por cancro a nível mundial. (2)

O adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC) corresponde a aproximadamente 85% de todos os casos de cancro do pâncreas (CP) (3) e apresenta uma taxa de sobrevivência global (do inglês OS – overall survival) aos 5 anos de 9% (1), principalmente, devido ao diagnóstico tardio manifesto do carácter silencioso e assintomático desta neoplasia, em estádios precoces da doença. (4)

O microambiente imune e inflamatório do estroma que rodeia as células neoplásicas do PDAC tem um papel importante no desenvolvimento e crescimento desta neoplasia. Acredita-se que atue como uma barreira física à distribuição dos fármacos e constitua um santuário imune para as células neoplásicas. (5)

Este estroma, definido pela sua desmoplasia, formação e hiperplasia de tecido fibroso, chega a representar 80% de todo o nódulo maligno e consiste, predominantemente, em fibroblastos associados ao tumor (do inglês CAFs – *cancer-associated fibroblasts*), matriz extracelular (ECM), pequenos vasos sanguíneos e células inflamatórias. (3)

A caracterização do componente imune e inflamatório deste microambiente pode desempenhar um papel prioritário na determinação do padrão de resposta do hospedeiro às células neoplásicas, por forma a proporcionar o desenvolvimento de imunoterapias e respostas imunomodadoras no tratamento desta neoplasia. (2)

Neste âmbito, o objetivo deste trabalho é realizar um artigo de revisão, baseado na literatura existente, com o formato IMRaD, sobre o impacto da reação inflamatória e imune na fisiopatologia do cancro do pâncreas e sua relação com a identificação de novos alvos terapêuticos,

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia tem como base uma pesquisa efetuada nas bases de dados bibliográficas Elsevier/ScienceDirect e PubMed e clinicaltrials.gov. Foram analisadas as publicações dos últimos doze anos, de 2009 a 2021, em língua portuguesa e inglesa, na tipologia de artigos de revisão, meta-análises, artigos de investigação e artigos científicos.

As palavras chaves utilizadas seguiram a nomenclatura *Medical Subject Headings* [MeSH]: neoplasias pancreáticas; inflamação; sistema imunitário, em inglês: *immune system; pancreatic neoplasms; inflammation;*

Por sua vez, para cada subcapítulo do Capítulo “Sistema imunitário e Cancro do Pâncreas” verificou-se necessidade de adicionar os seguintes termos à pesquisa, [MeSH]: *pancreatic neoplasms* “AND”

-immunotherapy; cancer-associated fibroblasts; pancreatic stellate cells ; neutrophils; t-lymphocytes, regulatory; myeloid-derived suppressor cells; tumor-associated macrophages; dendritic cells;

A pesquisas na base de dados bibliográfica PubMed obteve os seguintes resultados:

"Immune System" AND "Pancreatic Neoplasms" equivalente a 1854 resultados; dos quais 95 classificados como “Clinical Study” e 79 “Clinical Trial” e 111 aplicando o filtro “Review” (foram utilizados 2 do total de 111);

"Inflammation"[Mesh]) AND "Pancreatic Neoplasms"[Mesh], equivalente a 361 resultados, 11 aplicando o filtro “Clinical study” e 8 aplicando o filtro “Clinical Trial”, e 72 aplicando o filtro “Review” (foram utilizados 2 do total de 72).

DISCUSSÃO

1. Adenocarcinoma Ductal do Pâncreas

O adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC - *pancreatic ductal adenocarcinoma*) é uma neoplasia do pâncreas exócrino.

Tradicionalmente, identificou-se as células ductais do pâncreas como as células primárias na origem desta neoplasia.(6) Recentemente, a hipótese de existir uma metaplasia acinar-para-ductal (do inglês ADM – *acinar-to-ductal metaplasia*) foi identificada como um evento inaugural de lesões pré-neoplásicas de PDAC. (7,8) No entanto, qualquer um deste tipo de células ductais, acinares e centroacinares podem potencializar o início de um carcinoma invasivo, num contexto celular dependente de diferentes alterações genéticas promotoras de oncogénese. (8)

As neoplasias intraepiteliais pancreáticas (do inglês PanINs – *pancreatic intraepithelial neoplasias*), as neoplasias mucinosas papilares intraductais (do inglês IPMN – *intraductal papillary mucinous neoplasms*) e as neoplasias císticas mucinosas (do inglês MCN- *mucinous cystic neoplasms*) constituem as três principais lesões precursoras de PDAC, identificadas e defendidas através de diversos modelos de ratos geneticamente projetados (do inglês GEMM - *genetically engineered mouse models*) para desenvolvimento de PDAC, baseados, na maioria dos casos, na ativação do oncogene *KRAS*. (6–9) Enquanto a ativação do oncogene *KRAS* em células epiteliais pancreáticas é suficiente para iniciar o desenvolvimento do PDAC, a combinação com mutações *TP53*, *CDKN2a* e *SMAD4*, entre outras, acelera a progressão de PDAC e reitera muitas das características do PDAC humano. (9)

As PanINs são as lesões precursoras mais comuns do PDAC e, atualmente, segundo o *Consensus de Baltimore* e segundo a nova classificação da *World's Health Organization* (WHO), de 2019, são classificadas dependendo do grau de displasia, em *low-grade PanINs* (PanIN-1 e 2 WHO 2010), com baixa taxa de progressão, e *high-grade PanINs* (PanIN3 na WHO 2010), também referidas como “*carcinoma in situ*”. (10,11)

O estadiamento do PDAC rege-se, atualmente, pelo sistema de estadiamento de neoplasias do pâncreas exócrino apresentado na 8ª edição da American Joint Committee on Cancer (Tabela 1) e tem por base uma classificação TNM: em que T compreende o tamanho do tumor primário, N compreende o atingimento tumoral de gânglios linfáticos regionais e M compreende a presença de metástases à distância. (12)

Tabela 1 – Estadiamento TNM, Pâncreas Exócrino, AJCC 8ªedição, Adaptado (12)

ESTÁDIO	T	N	M	INTERPRETAÇÃO
0	Tis	N0	M0	<i>Carcinoma in situ</i> , inclui <i>high-grade</i> PanINs, entre outras lesões precursoras, sem metastização regional ou à distância.
IA	T1	N0	M0	Tumor limitado ao pâncreas, ≤2cm na sua maior dimensão, sem metastização regional ou à distância.
IB	T2	N0	M0	Tumor limitado ao pâncreas >2cm e ≤4cm na sua maior dimensão, sem metastização regional ou à distância.
IIB	T1, T2 ou T3	N1	M0	Tumor que, independentemente do tamanho, não atinge eixo celíaco, artéria mesentérica superior, e/ou artéria hepática comum e sem metastização à distância, mas com metástases regionais em até 3 gânglios.
III	T1, T2 ou T3	N2	M0	Tumor que, independentemente do tamanho, não atinge eixo celíaco, artéria mesentérica superior, e/ou artéria hepática comum, sem metastização à distância, mas com metástases regionais em pelo menos 4 gânglios.
III	T4	N0, N1 ou N2	M0	Tumor envolve eixo celíaco, artéria mesentérica superior, e/ou artéria hepática comum, independentemente do tamanho, sem metastização regional ou à distância.
IV	T1, T2, T3 ou T4	N0, N1 ou N2	M1	Qualquer tumor que independentemente do tamanho ou de metástases regionais, apresente metástases à distância.

T, tamanho do tumor primário; N, atingimento tumoral dos gânglios linfáticos regionais; M, presença de metástases à distância.

De igual forma, o PDAC pode ser classificado segundo os critérios de condição de ressecabilidade da *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* em tumor ressecável, tumor ressecável *boderline* e tumor irressecável (tumor localmente avançado ou presença de metástases à distância). (13)

No PDAC, a resseção cirúrgica é o principal objetivo, com um potencial curativo. No entanto, mais de metade dos pacientes com cancro pancreático têm metástases ao diagnóstico e a grande maioria dos que são submetidos a uma resseção cirúrgica R0 (remoção macro e microscópica completa do tumor) apresentam recorrência tumoral nos dois anos subsequentes. (12,14) Os tratamentos adjuvantes como a radioterapia e os agentes sistêmicos são, preferencialmente, utilizados pelo seu potencial de aumento da taxa média de sobrevivência, uma vez que, foi demonstrado que a gemcitabina a título adjuvante revelou-se superior versus a observação em doentes com PDAC ressecado.(14) Regimes de quimioterapia como os baseados em gemcitabina, 5-fluorouracil/leucovorin, FOLFIRINOX (ácido folínico, 5-fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina), gemcitabina+paclitaxel, entre outros estão aprovados para o tratamento sistémico do PDAC. (13) Porém estão em curso diversos ensaios clínicos e pré-clínicos com vista a identificação de novos possíveis alvos terapêuticos e melhorar, assim, o *outcome* desta neoplasia.

2. Sistema Imunitário

O mecanismo pelo qual o sistema imunitário, inato e adaptativo, é capaz de modular o crescimento e a progressão de uma neoplasia, denomina-se de imunoeedição tumoral (do inglês *cancer immunoediting*). (4) Este processo dinâmico divide-se em 3 fases: i) fase de eliminação, em que a vigilância imune (do inglês, *immunosurveillance*), proveniente da apresentação célula imune-célula maligna, culmina na eliminação do tumor; ii) fase de equilíbrio, onde surge o conceito de seleção imune (do inglês, *immunoselection*), em que a resposta impede o crescimento tumoral, mas é incapaz da sua eliminação; iii) fase de evasão, em que a resposta prevalece a favor da célula maligna, existindo tolerância imune (do inglês *immune tolerance*) permitindo uma progressão para doença clinicamente aparente. (15,16)

Neste mecanismo, participam células do sistema inato, que incluem neutrófilos, macrófagos, células *natural killer (NK)* e células dendríticas (CDs), e ainda células do sistema adaptativo, nomeadamente linfócitos B e T e seus subtipos. Estas células podem ser identificadas e os seus subtipos categorizados por expressarem diferentes moléculas de superfície celular, designadas de antígenios *cluster* de diferenciação (do inglês CD – *clusters of differentiation*). (17,18)

2.1 Sistema inato

Os neutrófilos são granulócitos polimorfonucleares (PMNs), e são das primeiras células a serem recrutadas na lesão tecidual. (19,20) A sua formação e migração para os tecidos lesados depende de estímulos quimiotáticos, isto é, de fatores de estimulação de colónias (do inglês CSF- *colony-stimulating factors*), entre os quais o de granulócitos (G-CSF), o de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o de macrófagos (M-CSF);(21,22) de quimiocinas da subfamília CXC ELR positivas (divisão de quimiocinas CXC em que a primeira cisteína é precedida pelo tripéptido Glu-Leu-Arg, com capacidade de ativação e recrutamento de neutrófilos (23)), como por exemplo as quimiocinas CXCL1-3 e CXCL5-8 que atuam por via do recetor CXCR2 (do inglês – *CXC motif chemokine receptor 2*) (24,25); de interleucinas (IL - citocinas inflamatórias produzidas por células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e leucócitos (23)) como a IL-2, IL-6, IL-10 e outras citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês VEGF – *vascular endothelial growth factor*). (22)

Os neutrófilos são células fagocíticas, secretam espécies reativas de oxigênio (ROS), serina proteases como a elastase neutrofílica (NE), metaloproteinases da matriz (MMP); produzem e secretam diferentes citocinas e quimiocinas, como por exemplo, quimiocinas da subfamília CC (resíduos de cisteína adjacentes (23)), CCL2, CCL3, CCL19 e CCL20, que atuam no recrutamento de outras células do sistema inato como monócitos e células dendríticas. (22,26) No entanto, a sua função é heterogênea e dependente de estímulos que caracterizam os tecidos lesados que infiltram, podendo adquirir um fenótipo N1, com elevada citotoxicidade, associado à produção de citocinas como a IL-1, 6, 17, TNF- α , ou um fenótipo N2, com baixa citotoxicidade, associado à produção de citocinas como a IL-1R α e fator de transformação do crescimento beta (do inglês TGF- β - *transforming growth factor beta*). (27)

Os macrófagos são células fagocíticas com um papel importante na homeostasia e reparação tecidual. Podem ter uma origem embrionária ou podem ser produto da diferenciação de monócitos que circulam na corrente sanguínea recrutados perante a ação de citocinas e quimiocinas provenientes de tecidos inflamados como o M-CSF, a CCL2 e o fator derivado de células estromais 1 (do inglês SDF-1 - *stromal cell derived factor 1*), também conhecido como CXCL12. (28,29) Nos tecidos, sobre influência de diferentes estímulos, os macrófagos polarizam-se em dois tipos celulares distintos: em resposta a lipopolissacarídeo (LPS), IL-12, IL-23, IL-18 e interferon gama (INF- γ) polarizam-se em células M1, iniciadoras da resposta inflamatória com um padrão de resposta celular T *helper* 1 (Th1); e em resposta a IL-3, IL-4, IL-10 e IL-13 polarizam-se em células M2, imunossupressoras, culminando num padrão de resposta T *helper* 2 (Th2). (30,31)

As células NK são, por definição, uma população que possui propriedades citotóxicas que permitem a indução de morte celular na ausência de sensibilização (não antigénio-específica), através do reconhecimento de moléculas de superfície celular. Apresentam recetores de superfície ativadores e inibidores que permitem discernir e identificar células alvo para indução de morte celular e produzem grânulos citotóxicos e citocinas que exacerbam esta resposta. (32) São geralmente identificadas pelo antigénio CD56, também conhecido por molécula de adesão celular neuronal (do inglês NCAM – *neural cell adhesion molecule*). (33)

As células dendríticas são, por definição, células apresentadoras de antígenos (do inglês – APCs – antigen-presenting cells) especializadas. São células do sistema hematopoiético localizadas no sistema linfático e em tecido não linfóide como a pele, epitélio intestinal, trato respiratório e reprodutivo e são responsáveis pela vigília e captação de antígenos patogênicos, que desencadeiam a sua ativação, maturação e migração para o tecido linfóide, onde estimulam a ativação e diferenciação de células T, culminando numa resposta celular. Nos folículos, as células dendríticas permitem o desenvolvimento de uma resposta humoral, uma resposta imune mediada por anticorpos, por estimulação da formação e diferenciação de Linfócitos B. (34,35) Durante este processo, dependente do processamento antigênico, expressam diferentes moléculas de superfície celular como, por exemplo, CD40, CD80, CD86, MHC II e o ligando da proteína de morte celular programada 1 (do inglês PD-L1 - *programmed cell death ligand 1*) e produzem citocinas como a IL-12, entre outras, que influenciam o padrão de resposta celular. (36)

2.2 Sistema adaptativo

Os linfócitos B, CD19⁺, após ativação e apresentação antigênica mediada pelas APC, diferenciam-se em plasmócitos, que são fábricas de anticorpos (imunoglobulinas), ou em células B de memória. (19,37) São o centro da resposta humoral do organismo, pois estes anticorpos, por definição, numa forma antígeno-específica, identificam células alvo a destruir pelo sistema imune, ação denominada de opsonização.

As células T (CD3⁺), responsáveis pela imunidade celular, têm origem na medula óssea e maturação no timo. A sua diferenciação em células T CD4⁺ e células T CD8⁺ (citotóxicas) depende das proteínas do complexo major de histocompatibilidade (do inglês MHC – *major histocompatibility complex proteins*) da classe II e I, respetivamente.(38) A sua ativação é mediada pelas APCs, nomeadamente através de um reconhecimento antigénico via *T-cell receptors* (TCRs) e da interação entre CD28 das células T e a correspondente proteína da família B7 (CD80/86) das APCs. (27) As suas funções e padrões de resposta (citotóxica, Th1, Th2, Th17, reguladora) dependem de estímulos originados no microambiente onde atuam.(39) As células T, igualmente, expressam recetores inibidores como o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (do inglês CTLA-4- *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) e a proteína de morte celular programada 1 (do inglês PD-1 - *programmed cell death 1*), cuja interação com respetivos ligandos, CD80/86 e PD-L1, resulta na redução da atividade e do número deste grupo celular. (27)

Os linfócitos T (CD4+), por definição, são uma subpopulação de células T produtoras de citocinas e como tal, são mediadores da resposta imune e inflamatória e cooperam na ativação e/ou inibição de outras células do sistema imune. Podem ser divididos em duas subpopulações, a subpopulação de linfócitos T *helper* (do inglês Th - *helper inducer T-lymphocytes*) e a subpopulação de linfócitos T reguladores (do inglês Treg - *regulatory T-lymphocytes*). Os linfócitos Treg, células CD25⁺ e Foxp3⁺ (do inglês proteína *forkhead box P3* - um fator de transcrição regulador do desenvolvimento e função dos linfócitos Treg), desempenham um papel importante na regulação e supervisão da resposta celular, evitando uma resposta exagerada e exercendo um controle inibitório sobre as outras células imunes, prevenindo a autoimunidade. (40–43)

Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), por definição, têm um papel importante no reconhecimento e eliminação de células que expressam moléculas derivadas de alterações intracelulares que fujam à normalidade do próprio organismo (do inglês *self*) e são conhecidos, em conjunto com as células T *helper*, como células T efetoras. (44)

O padrão de resposta Th1, por definição, é o resultado da ação do conjunto de citocinas: IL-2, TNF- α , e INF- γ , produzidas por células T *helper* do tipo 1 (CD4⁺). Estas citocinas têm um impacto no recrutamento e ativação de células T CD8⁺, macrófagos e células NK.(19) No contexto de uma neoplasia, este padrão de resposta é muitas vezes interpretado como anti-tumoral, pois permite que as células imunes adquiram um fenótipo que culmine a favor da eliminação de células neoplásicas. (45,46)

O padrão de resposta Th2 é o resultado da produção das citocinas: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 por células T *helper* do tipo 2 (CD4⁺), importantes no reforço da resposta humoral, culminando na produção de imunoglobulinas do tipo E (fortemente relacionadas com a resposta atópica) e, em contraste com o padrão de resposta Th1, pode apresentar um efeito supressor da imunidade celular. (47–49)

O padrão de resposta Th17, por definição, é o resultado da produção das citocinas IL-17, IL-21 e IL-22 por linfócitos T *helper* do tipo 17 em resposta a TGF- β e a IL-6. Este padrão está associado a doenças autoimunes e inflamatórias, com aumento do recrutamento de granulócitos e células T citotóxicas. (15,39)

3 Imunoterapia

A imunoterapia corresponde à manipulação do sistema imunitário de um hospedeiro para tratamento de uma doença. Neste artigo de revisão, concentramo-nos na imunoterapia ativa. A imunoterapia ativa define-se na administração de vacinas para fins preventivos ou terapêuticos e na administração de agentes potenciadores do sistema imunitário, modificadores da resposta biológica, com a finalidade de estimular diretamente o sistema imunitário. A imunoterapia baseada em inibidores de *checkpoints* imunes (do inglês ICIs – *immune checkpoint inhibitors*), nomeadamente anti-CTLA4 e anti-PD-1/PD-L1, é um exemplo de imunoterapia ativa e, embora tenha revolucionado a era da imunoterapia, tem se revelado insuficiente no PDAC, em parte por não atuar especificamente em células tumorais, mas também pela sua eficácia ser influenciada pelo microambiente imunossupressor que caracteriza esta neoplasia. (50,51)

4 Sistema Imunitário e Cancro do pâncreas

4.1 Microambiente Tumoral:

O microambiente tumoral do adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC) apresenta uma natureza complexa.

O estroma desmoplásico que o caracteriza é constituído, essencialmente, por células imunes, células inflamatórias, fatores de crescimento, matriz extracelular e fibroblastos que, em conjunto, podem representar 15% a 80-85% do tumor. O estroma desmoplásico localiza-se no centro das células neoplásicas e das células normais do órgão, na denominada região peri-tumoral, uma zona de grande stress, dada a intensa produção e libertação de mediadores inflamatórios pelo tumor. Este stress explica a sua morfologia distorcida, inflamada e, em parte, a génese de uma resposta imune e inflamatória que se acredita poder influenciar a evolução do PDAC. (47,52–54)

Embora muitos estudos defendam que o ambiente desmoplásico, ao representar um importante mediador da imunossupressão característica do PDAC, facilite o crescimento e a progressão desta neoplasia, os ensaios pré-clínicos que discutimos ao longo deste trabalho vêm demonstrar a existência de grande heterogeneidade dentro do estroma e que este não deve ser interpretado como um todo.

Um bom exemplo deste fenómeno é a via de sinalização *sonic hedgehog* (Shh), que participa na regulação do desenvolvimento embrionário de muitos tecidos, sendo reativada no contexto de inflamação e neoplasia. A expressão de Shh está aumentada na presença de lesão pancreática, acompanha o aumento da dimensão do estroma desmoplásico e está presente na progressão do PDAC, sendo observada precocemente na ADM e nas lesões precursoras PanINs. (55–57)

No entanto, Rhim *et al.*, num ensaio pré-clínico, verificaram que a via de sinalização Shh está presente em células estromais, nomeadamente, em miofibroblastos actina do músculo liso alfa positivos (SMA- α^+), os quais contribuem para a formação de fibrose, mas, pelo contrário, não observaram benefício na inibição da via Shh. Verificaram que a diminuição da dimensão tumoral, por redução da percentagem estromal, condicionou neste ensaio, um aumento da indiferenciação e um aumento do índice proliferativo e vascular. (56)

Também, Özdemir *et al.*, num ensaio pré-clínico, observaram que tumores com depleção de miofibroblastos SMA- α^+ , apresentavam um aumento na indiferenciação, necrose e capacidade de invasão tumoral, comparativamente com o controlo. (58)

4.1.1 Principais Intervenientes

4.1.1.1 Fibroblastos Associados ao tumor; Células Estreladas Pancreáticas

As células pancreáticas estreladas (do inglês *pancreatic stellate cells* – PSCs), e fibroblastos associados ao tumor (do inglês *cancer-associated fibroblasts* – CAFs) fazem parte da constituição do TME.(59) As PSCs são a principal fonte de CAFs no PDAC. Os CAFs têm também origem, em menor percentagem, em células derivadas da medula óssea e em fibroblastos residentes. (3)

Öhlund *et al.* identificaram duas subpopulações/fenótipos de CAFs, os iCAF (do inglês iCAF- *inflammatory CAFs*) e os myCAF (do inglês myCAF- *myofibroblastic CAFs*). A primeira apresentava expressão de marcadores inflamatórios, como a IL-6 e fator inibidor de leucemia (do inglês LIF- *leukemia inhibitory factor*). Já a segunda, marcadores de miofibroblastos, como, por exemplo, o SMA- α . (60) Esta heterogeneidade explica porque é que alguns tipos de CAFs podem ser a favor da progressão tumoral (do inglês- *cancer promoting CAFs* – pCAF) enquanto outros a restringem (do inglês *cancer-restraining CAFs* – rCAF) (61). Este estudo permitiu, de igual forma, compreender os resultados de Özdemir *et al.* e de Rhim *et al.*, cujos estudos incidiram no subtipo myCAF (56,58) e, em parte, a os resultados de um ensaios clínico que incidiu na inibição da via Shh (Tabela 2);

Curiosamente, Mizutani *et al.* identificaram a proteína Meflin com um possível marcador de rCAF. No entanto, verificaram que a progressão tumoral condiciona a diferenciação de células Meflin⁺ em células SMA- α ⁺ (diferenciação em myCAF). Verificaram, ainda, que este marcador é expresso em resposta a vitamina D. (61) No entanto, Gorchs *et al.*, embora tenham verificado que o *calcipotriol* (análogo da vit D) reduziu a população de CAFs e de IL-6, este também diminuiu a resposta celular (aumento PD-L1) (62)

Elyada *et al.* identificaram uma nova subpopulação de CAFs MHCII⁺ e CD74⁺ com capacidade APC (do inglês apCAF - *antigen-presenting CAFs*). Por sua vez, identificaram o recetor de angiotensina II do tipo 1 (AGTR1) como um marcador da subpopulação iCAF e um potencial inibidor deste recetor, o losartan. (63) Na Tabela 2 podemos observar os resultados obtidos de um ensaio que incidiu na utilização de losartan.

Biffi *et al.* observaram que a secreção tumoral de TGF- β promove um predomínio da subpopulação de myCAFs. Contrariamente, a IL-1 α e a ativação da via de sinalização JAK/STAT (família de tirosina cinases JAK – do inglês *Janus-activated kinase* / fatores de transcrição da família STAT) promovem um fenótipo iCAFs (64) A ativação da via de sinalização JAK/STAT foi identificada previamente por Corcoran *et al.*, como essencial na oncogênese e progressão do PDAC. (65) Na Tabela 2 podemos observar informação relativa aos resultados de ensaios que incidiram na inibição desta via de sinalização.

A via de sinalização NF-kB (do fator de transcrição nuclear kappa B), também, tem um papel importante no desenvolvimento e progressão do PDAC e representa uma ponte de ligação entre inflamação e neoplasia.(66) Garg *et al.* verificaram que a ativação da via de sinalização NF-kB em PSCs promove o crescimento tumoral através do aumento da expressão da quimiocina CXCL12, diminuindo o recrutamento e a infiltração de células T citotóxicas. (67) Por sua vez, Feig *et al.* verificaram que os CAFs produzem CXCL12 com um grande efeito imunossupressor sobre células T. Igualmente, observaram que a inibição do seu recetor CXCR4 provocou um aumento do infiltrado de células T e reproduziu um efeito sinérgico com inibidores do *checkpoint* anti-PD-L1. (68) Na Tabela 2 podemos observar informação relativa aos resultados de um estudo experimental que incidiu na inibição do eixo CXCL12-CXCR4;

Níveis elevados de IL-6 e IL-1 β foram identificados como fatores de pior prognóstico, por Mitsunaga *et al.*, em pacientes com cancro pancreático avançado sob terapêutica com gemcitabina (69)

Zhang e colegas, em 2018, identificaram benefício na inibição do eixo IL1 β -IRAK4, uma vez que reduziu a fibrose estromal, suprimiu a proliferação tumoral e aumentou a eficácia de gemcitabina, *in vivo*. (70)

Awaji *et al.* verificaram que os CAFs contribuem de forma parácrina na sobrevivência e proliferação de células PDAC. Com recurso a anticorpos anti-FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos (do inglês FGF-2 – *fibroblast growth factor 2*) e anti-CXCL8, observaram que apenas o primeiro diminui o efeito dos CAFs no que diz respeito à proliferação e sobrevivência das células malignas, e que o segundo diminui o número de CAFs. (71)

Tabela 2 Ensaio Clínicos CAFs

Autores	Ensaio	Tratamento	Resultados
De Jesus- Acosta <i>et al.</i> , 2020 (72)	Clínica fase II PDAC metastizado	Inibidor <i>hedgehog</i> (<i>vismodegib</i>) + gemcitabina+nabpaclitaxel	- Sem aparente benefício na adição de vismodegib ao regime gemcitabina+ nab-paclitaxel
Hurwitz <i>et al.</i> , 2018 (73)	Clínico randomizado de fase III, PDAC avançado/metastizado	Inibidor da JAK1/JAK2 (<i>ruxolitinib</i>) + capecitabina versus capecitabina + placebo	- Sem diferenças significativas na OS e na taxa de progressão livre de doença
Ng <i>et al.</i> , 2020 (74)	Clínico de fase I, PDAC metastizado	<i>Momelotinib</i> (um inibidor JAK1/2) + gemcitabina + nab-paclitaxel	- Sem aparente benefício na adição
Murphy <i>et al.</i> , 2019 (75)	Clínico de fase II, NCT01821729, 39 de 49 doentes com PDAC localmente avançado	FOLFIRINOX, <i>Losartan</i> e Quimiorradioterapia	- Regressão do estágio da doença (<i>downstaging</i>) e resseção cirúrgica em 34 doentes
Hong T S., MD, Massachus etts General Hospital(76)	Ensaio clínico de fase II PDAC (ressecável boderline ou LA), NCT03563248	FOLFIRINOX <i>Antagonista AGTR1</i> (<i>losartan</i>) , ICI anti-PD-1 (<i>nivolumab</i>) Cirurgia Radioterapia	Em curso
Biasci <i>et al.</i> , 2020, (77)	Estudo experimental NCT02179970 PDAC MSS avançado/metastizado	Inibidor CXCR4, AMD3100 (plerixafor)	-Aumento de células T CD8+ em biópsias de metástases -Diminuição CXCL8 - Possível Sinergia com ICI

OS – overall survival; AGTR1 –receptor da angiotensina II do tipo 1; ICI – inibidores de *checkpoints* imunes; MSS – estabilidade de microssatélites;

4.1.1.2 Linfócitos T reguladores e MDSCs

O PDAC é caracterizado pela existência de uma profunda imunossupressão, que se inicia muito precocemente. De facto, em lesões precursoras, como as PanINs, predominam infiltrados de linfócitos Treg e de células supressoras derivadas de mielóide (do inglês, MDSCs - *myeloid-derived suppressor cells*). (78) Este dois grupos celulares, justificam, em parte, o défice de linfócitos T citotóxicos CD8+ no TME (43,79)

As MDSCs são, por definição, uma população heterogénea derivada de células progenitoras mielóides que não terminaram a sua diferenciação. Podem ser divididas, por variação da expressão de marcadores de superfície celular, na linha monocítica (MO-MDSC ou M-MDSC) e na linha polimorfonuclear (PMN-MDSC ou G-MDSC). Apresentam atividade essencialmente imunossupressora: inibem o recrutamento, a proliferação e a atividade de células T efetoras (aumentam os níveis de arginase-1, enzima que metaboliza e reduz a quantidade de arginina, substrato da proliferação de linfócitos T); expressam recetores inibidores como o PD-L1 e o CTLA4; produzem substâncias reativas de oxigénio (ROS) e substâncias reativas de nitrogénio (RNS)), e participam na sustentabilidade de células Treg (pela secreção de TGF- β e IL-10). (79–82)

Curiosamente, Siret *et al.*, observaram, as MDSCs apresentavam dupla função, quer supressora da proliferação de células T, quer promotora da morte celular de células T, e observaram contacto celular entre as MDSCs e as células Treg. (83)

Previamente, Tan *et al.* verificaram superioridade numérica das células Treg e que aproximadamente 80% destas células expressavam o recetor CCR5. A inibição do eixo CCL5-CCR5 reduziu a prevalência de células Treg no microambiente tumoral e abrandou o crescimento tumoral (40) Analogamente, Huang *et al.*, em 2020, estudaram a utilização de *maraviroc*, um antagonista do recetor CCR5, verificaram que promovia a diminuição da proliferação tumoral. (84) Por sua vez, Wang *et al.* verificaram que o FOXP3 promove a transcrição de CCL5, por ligação ao seu promotor nas células malignas, o que, por sua vez, aumenta o recrutamento de células Treg. (42) Fan *et al.* constataram que existe uma associação entre a expressão de FOXP3, o aumento de IL-6 e o um aumento de células Treg (85)

Em continuação, Wang *et al.* verificaram que o FOXP3 promove, igualmente, o aumento da expressão de PD-L1, existindo benefício sinérgico anti-tumoral aquando da utilização combinada de inibidores de *checkpoint* anti-PD-L1 e anticorpos anti-CCL5.(86) Estão em curso ensaios clínicos de fase 1 relacionados com a inibição deste eixo CCL5-CCR (Tabela 3)

No entanto, contrariamente ao esperado, Zhang *et al.* verificaram que a depleção de células Treg condicionou uma diminuição de células acinares, um aumento de ADM, a promoção de um estado de pancreatite e um aumento de lesões precursoras PanINs, (43)

Tabela 3 Ensaios Clínicos Treg

Autores	Ensaio	Tratamento	Resultados
Lim K, Ph.D, Washington University School of Medicine (87)	Clínicos de fase I, NCT03767582, PDAC localmente avançado	ICI anti-PD-1 (<i>nivolumab</i>) + antagonista duplo anti-CCR2/anti-CCR5 BMS-813160 +/- GVAX	Em curso
Zheng L, MD, Johns Hopkins Medical Institution (88)	Clínico de fase 1, NCT03496662 PDAC ressecável e borderline localmente avançado	ICI anti-PD-1 (<i>nivolumab</i>) + gemcitabina nab-paclitaxel+ antagonista duplo anti-CCR2/anti-CCR5 (BMS-813160)	Em curso

GVAX -uma vacina, *ex vivo*, composta por duas linhas celulares de PDAC, irradiadas e GM-CSF+ (89)

ICI – inibidores de *checkpoints* imunes;

Relativamente às MDSCs, Song *et al.*, num ensaio pré-clínico, correlacionaram o aumento do recrutamento e ativação de MDSCs com o aumento da expressão de CXCR4 promovido pela proteína PAUF (do inglês – *pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor*) (90) De facto, a inibição deste recetor demonstrou atividade num ensaio clínico. (Tabela 4)

Porembka *et al.*, num ensaio pré-clínico verificaram que o tratamento com ácido zoledrónico (do inglês – *zoledronic acid* - ZA) diminuía o infiltrado intra-tumoral de MDSCs e aumentava o infiltrado de células T CD8⁺. (91) No entanto, não se observou benefício na utilização de ZA. (Tabela 4).

Christmas *et al.*, num ensaio pré-clínico verificaram que a utilização combinada de *entinostat* (ENT), um inibidor de deacetilases de histonas (do inglês – *histone deacetylase* – HDAC) com inibidores anti-PD-1 e/ou anti-CTLA-4, melhorou significativamente a OS, verificando um aumento do fenótipo G-MDSC e uma diminuição da sua função imunossupressora. (81)

Tabela 4 Ensaio Clínicos MDSCs

Autores	Ensaio	Tratamento	Resultados
Bockorny et al., 2020 (92)	Clínico de fase IIa, NCT02826486, PDAC metastizado após tratamento de 1ª linha, gemcitabina	Antagonista CXCR4, (<i>motixafortide</i>) + ICI <i>anti-PD-L1</i> (<i>pembrolizumab</i>) + <i>NAPOLI-1</i>	-PR de 22%. SD de 45%, DCR de 77% Diminuição intra-tumoral de G- MDSCs e aumento de células T CD8 ⁺ e CD4 ⁺ ativadas
Sanford et al., 2013 (93)	Clínico de fase 1, NCT00892242, PDAC ressecável e não- metastizado	ZA, a título neoadjuvante	OS e PFS ao 2º ano de 33,3% e 8,9%, respetivamente. Não observaram diferenças em comparação a controlo histórico definido para o ensaio

ICI- inibidores de *checkpoints* imunes; PR – resposta parcial; SD – doença estável; DCR- taxa de controlo de doença; OS- overall survival; PFS – progressão livre de doença; ZA- ácido zoledrónico;

4.1.1.3 Monócitos e Macrófagos Associados ao Tumor

As lesões precursoras PanIN são rodeadas precocemente por um ambiente inflamatório dominado por macrófagos associados ao tumor (do inglês TAMs - *tumor-associated macrophages*) que persistem até estádios invasivos da doença.(94) Os macrófagos associados ao tumor têm um comportamento predominante M2, contribuem para a ativação de linfócitos Treg, promovem a angiogénese e, através da secreção de arginase-1, diminuem a proliferação de linfócitos T (30,59,78), desempenhando um papel importante na progressão tumoral, crescimento, angiogénese e metastização do PDAC. (47)

Bishehsari *et al.*, verificaram que a mutação KRAS promove a polarização de macrófagos para um fenótipo do tipo M2 (aumento da expressão de Arg-1). Observaram uma correlação deste fenótipo com o aumento de metaplasia acinar-ductal (ADM). (95)

Os mecanismos de recrutamento de monócitos e de macrófagos no contexto do PDAC têm sido amplamente estudados, não só porque permitem compreender o impacto deste grupo celular no TME, mas também porque permitem o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, que visam a sua inibição.

No PDAC, a via quimiotática CCL2/CCR2, desempenha um papel importante no recrutamento de monócitos e na sua diferenciação em TAMs. (94) De facto, Sanford *et al.* verificaram que o bloqueio desta via com recurso ao antagonista da cinase do CCR2, PF-04136309 (*Pfizer*) diminui o recrutamento de TAMs e condicionou diminuição do crescimento e da capacidade de invasão tumoral. (96) Nywening *et al.* reportaram que a redução de TAMs resulta num aumento compensatório de neutrófilos associados ao tumor (do inglês TANs - *tumor-associated neutrophils*), e que este aumento poderá contribuir para a falência ou diminuição da eficácia terapêutica da inibição CCR2. (25) Apresentamos os resultados de ensaios clínicos relacionados com a inibição deste eixo na Tabela 5.

Zhu *et al.* observaram que o CSF-1 (também conhecido como M-CSF) é produzido pelas células neoplásicas. Verificaram que a inibição do eixo CSF-1/CSFR1 diminuiu o número de TAMs e MO-MDSCs, favorecendo uma resposta anti-tumoral, no entanto reportaram um aumento compensatório da expressão PD-L1 e anti-CTLA-4. (97)

Posteriormente, Candido *et al.* e verificaram que um inibidor seletivo do CSF1R, reduziu significativamente o número total de TAMs, bem como a percentagem de células CSF1R⁺ e os níveis de IL-6, e aumentou o fenótipo M1 no TME, promovendo uma resposta anti-tumoral com redução da massa tumoral, e com repercussão no aumento da OS. Reportam um aumento compensatório de CCL2 e CCL12 (98)

No mesmo ano, Saung *et al.*, num ensaio pré-clínico, verificaram benefício na adição de anti-CSF-1R à combinação de GVAX e do tratamento com ICI, uma vez que, a nível do TME, promoveu um aumento de células T CD4⁺PD1⁺ e CD8⁺ PD-1⁺, destacando-se pelo um aumento da expressão dos marcadores de ativação destas células, CD137, e de CD134. (99)

Chen *et al.*, verificaram que o PDAC promove a produção e libertação de IL-1 β em macrófagos M2 no microambiente tumoral e que, por sua vez, a IL-1 β inibe a apoptose de células malignas e participa no recrutamento de MDSCs, promovendo a progressão do PDAC. Identificaram a inibição da COX-2 como um novo possível novo alvo terapêutico (100)

Tabela 5 – Ensaio clínicos TAMs e Monócitos

Autores	Ensaio	Tratamento	Resultados
Nywening <i>et al.</i> , 2016, (101)	Clínica fase Ib, NCT01413022, PDAC ressecável boderline e localmente avançado	FOLFIRINOX + Antagonista da cinase do CCR2 (PF-04136309)	- PR de 48,5% e DCR de 97%, PD em 1 doente - Regressão estádio em 10 doentes. -Diminuição monócitos circulantes e do infiltrado de TAMs -Aumento de IL-12 e TNF- α
Noel <i>et al.</i> , em 2019 (102)	Clínico de fase Ib, NCT02732938 PDAC Metastizado	Antagonista da cinase do CCR2 (PF-04136309) + gemcitabina nab-paclitaxel, 1 ^a linha	Ausência de benefício na adição de PF-04136309 ao regime de quimioterapia

PR – resposta parcial; DCR- taxa de controlo de doença; PD – progressão de doença; OS- overall survival; PFS – progressão livre de doença;

4.1.1.4 Neutrófilos Associados ao Tumor:

O PDAC também promove a infiltração de neutrófilos associados ao tumor. Este infiltrado de polimorfonucleares (PMN) está localizado, quer na proximidade das células neoplásicas, quer no estroma, e correlaciona-se com o crescimento indiferenciado desta neoplasia, e com o seu mau prognóstico. (22)

Bausch *et al.* verificaram que a MMP-9 é produzida exclusivamente pelas células PMNs e apresenta um efeito angiogénico aditivo e independente do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Identificaram a doxiciclina, um antibiótico, como um inibidor da angiogénese mediada por MMP-9, e demonstraram que a sua utilização, *in vivo*, foi eficaz na redução do crescimento tumoral, e na redução da densidade média vascular. (103)

O estudo de mecanismos de recrutamento de neutrófilos também tem proporcionado a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos, no contexto do PDAC. Chao *et al.* verificaram que o estroma do PDAC apresentava uma elevada expressão da quimiocina CXCL5 e de CXCL8, que se incluem no grupo de ligandos do recetor CXCR2. Verificaram que a depleção genética de CXCR2 condicionou uma diminuição de TANS, adiamento do crescimento tumoral, com impacto no aumento da sobrevivência. (104)

Previamente, Song *et al.*, num ensaio pré-clínico, verificaram aumento da expressão de CXCL8 no tratamento com gemcitabina e que a utilização de um anticorpo anti-CXCL8 atenuou o crescimento tumoral e reduziu a vascularização intra-tumoral. (105) Analogamente, Fu *et al.*, em 2018, verificaram que a inibição do eixo IL-8 - CXCR1/2 com recurso aos antagonistas CXCR1/2, reparixin e SCH527123, reproduziu uma diminuição dose-dependente da viabilidade das células malignas. (106)

Por sua vez, Nywening *et al.* observaram que o aumento sistémico de TANS CXCR2⁺ correlaciona-se com um mau prognóstico do PDAC. Observaram que o PDAC é fortemente infiltrado por TANS CXCR2⁺ por ação da quimiocina CXCL5. Constataram que a combinação da inibição do recrutamento de TAMs (inibição CCR2) com a inibição do recrutamento de TANS (inibição CXCR2) com o regime de quimioterapia FOLFIRINOX, reduziu o infiltrado tumoral de células mieloides, aumentou o influxo e o grau de ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no tumor e reduziu o infiltrado de células Treg. (25)

Também, previamente, num ensaio pré-clínico, Steele *et al.* verificaram que a inibição do recetor CXCR2, promoveu a infiltração de células T, reduziu a metastização e aumentou a taxa de sobrevivência. Igualmente verificaram benefício da sua combinação com gemcitabina e sensibilização para ICI anti-PD1. (107) Mais recentemente, Awaji *et al.*, num ensaio pré-clínico, verificaram que o oncogene KRAS está associado ao fenótipo iCAF e que a inibição CXCR2 promove a ativação de miofibroblastos, com impacto tumoral. (24)

No entanto, o padrão de resposta que domina no microambiente tumoral pode influenciar o fenótipo e a polarização dos TANs e o seu comportamento, anti-tumoral ou pro-tumoral, devendo existir sempre a ponderação da heterogeneidade desta população, à semelhança de outras células do sistema imunitário.(108)

Caisová *et al.* através da combinação de agonistas TLR (R-848, *poly* (I:C), LTA) e de compostos estimulantes de fagocitose (*mannan-BAM*), observaram que este tratamento aumentou o recrutamento de granulócitos (ativados com recurso a G-CSF e a TNF- α) e de células NK, condicionando uma redução do crescimento tumoral e uma supressão da metastização, neste ensaio pré-clínico. (109)

Brú *et al.*, num ensaio pré-clínico, verificaram que a utilização do fator de estimulação de colónias de granulócitos recombinante humano (rhG-CSF) aumentou o número de granulócitos e destacou-se pelo aumento da percentagem e centralização da de necrose intra-tumoral e pela maior centralização de necrose tumoral, embora com taxas de proliferação celular semelhantes às observadas com o tratamento com gemcitabina. (110)

Está em curso um ensaio clínico, NCT04338763, com vista à utilização de um antagonista duplo anti-CXCR1 e anti-CXCR2, RP72, em monoterapia ou em associação com gemcitabina, em doentes com CP. (111)

4.1.1.5 Células Dendríticas:

As células dendríticas, com frequência, no ambiente tumoral, apresentam um fenótipo imaturo, e na circulação periférica destes pacientes, estas células dendríticas encontram-se em menor número e debilitadas na sua função de estimular a proliferação de linfócitos T. (112)

Lin *et al.*, num ensaio pré-clínico, observaram que só a neutralização de IL-6 e não a de IL-1 β aumenta os níveis de cDC1s. A utilização combinada de agonistas anti-CD40 (o CD40 é um recetor expresso nas APC, que promove a sua maturação) e agonistas anti-Fit3 (um recetor tirosina-cinase que especificamente promove a diferenciação e sobrevivência das cDC1s) demonstrou benefício e sinergia no aumento desta população..(36)

Analogamente, no mesmo ano, Hegde *et al.*, num ensaio pré-clínico, verificaram benefício na utilização combinada da terapia tripla de Fit3L, agonista anti-CD40 e radioterapia (RT), que demonstraram ser superior a RT isolada. (35) Na Tabela 6 podemos observar a informação de ensaios clínicos terminados ou decorrer alusivos a terapias dirigidas a células detríticas.

Tabela 6 Resumo – Células Dendríticas Ensaios Clínicos

Autores	Ensaio	Tratamento	Resultados
Beatty <i>et al.</i>, 2013(113)	Clínico de fase I PDAC avançado	Agonista CD40 (CP-870,893) + gemcitabina como 1 ^o linha	- Demonstrou atividade clínica transitória - Aumento de IL-6, IL-8 e IL-10
O'Hara <i>et al.</i>, 2021(114)	Clínico de fase Ib/II, NCT03214250	Agonista CD40 (<i>sotigalimab</i>) + gemcitabina nabpaclitaxel +- ICI anti-PD-1 (<i>nivolumab</i>)	- Ainda a decorrer, resultados preliminares indicam tolerância ao tratamento e resposta clínica promissora
Hawkin W G, M.D, Washington University School of Medicine(115)	Clínico, NCT04536077	Agonista CD40 (CDX-1140) em +- Recombinante Fit3L (CDX-301)	Em curso

ICI- inibidores de *ckeckpoints* imunes;

CONCLUSÕES

O microambiente tumoral é amplamente diversificado na sua constituição celular e estromal, desempenhando um papel importante na resposta do hospedeiro contra o PDAC. O estroma isola a neoplasia do restante órgão e pode apresentar um papel protetor, por exemplo anti-angiogénico e, em certo modo, diminuir a capacidade de invasão das células tumorais. No entanto, ao longo da revisão, também constatámos que TME apresenta na sua constituição elementos que favorecem a progressão tumoral, como por exemplo o efeito angiogénico da MMP-9. Igualmente, sabemos que o estroma pode condicionar uma diminuição da distribuição e da eficácia de fármacos, como os agentes sistémicos utilizados no combate da neoplasia.

Concluimos, por conseguinte, que o microambiente tumoral é uma entidade extremamente heterogénea e complexa, podendo apresentar um papel restritivo e ao mesmo tempo um papel promotor da progressão tumoral, o que permite, em parte, justificar os resultados inesperados de ensaios pré-clínicos e clínicos que incidiram de uma forma ampla no estroma, como por exemplo, aquando da inibição da via de sinalização Shh. Por este motivo, acreditamos que a redução deste estroma deve ser específica e direcionada.

Como pudemos averiguar, o estroma fibrótico é igualmente rico em células, fatores, citocinas e quimiocinas inflamatórias que orquestram o equilíbrio da resposta imune e inflamatória. O estudo destes mediadores tem demonstrando grande interesse na comunidade científica e acreditamos que venham a desempenhar um papel importante na identificação de novos alvos terapêuticos.

Percebemos que a sua intensa desmoplasia, tem origem na população de fibroblastos, que denominámos de fibroblastos associados ao tumor. Esta classificação importa características que os fibroblastos adquirem no contexto de uma neoplasia sólida, principalmente no PDAC, que os tornam um alvo muito interessante. Ainda não é possível afirmarmos e delinear-mos com exatidão o papel na restrição e progressão da neoplasia dos myCAFs, iCAFs ou mesmo, apCAFs, que foram identificados recentemente como novas subpopulações destes fibroblastos. No entanto, na análise que efetuámos, sugerimos a hipótese de os myCAFs apresentarem um papel rCAF, principalmente pelos resultados observados na sua depleção, mas também pela depleção de Tregs ter promovido a diminuição da população de myCAFs, e ainda pela associação recente entre a inibição

CXCR2 (recrutamento de neutrófilos) e a diferenciação em myCAFs. (24) Contrariamente, sugerimos a hipótese de os iCAFs apresentarem um papel pCAF, visto existir associação entre o KRAS e este fenótipo. Não obstante, inibição do eixo CXCL12-CXCR4 demonstrou interesse na diminuição do recrutamento de CAFs em ensaios clínicos, embora em estudos sem diferenciação das subpopulações. É pertinente lembrar que pode existir um equilíbrio entre os papéis pro-tumoral e anti-tumoral de qualquer célula sob influência direta do tumor.

Apurámos, também, que os monócitos/macrófagos associados ao tumor representam uma população importante na constituição do estroma e na relação deste com o tumor. Efetivamente, percebemos que existe um equilíbrio entre os seus fenótipos M1 e M2, estando este último associado ao KRAS. Foi possível também constatar que o fenótipo M2 predomina no TME e apresenta um impacto negativo na resposta imune e inflamatória. Consequentemente, a inibição dos eixos CCL2-CCR2 e CSF1-CSFR1 demonstrou um interesse crescente, ao contrariar a influência do PDAC nesta população e reduzir o predomínio M2 no microambiente tumoral. Contudo, a redução de TAMs resultou numa resposta compensatória e aumentou a população de TANs. Analogamente, apurámos que o recrutamento e o fenótipo de TANs é influenciado por fatores e quimiocinas produzidas pelo tumor e que a inibição do eixo CXCL5-CXCR2 demonstrou interesse ao permitir diminuir o infiltrado desta população e, principalmente, por apresentar sinergia com a inibição do eixo CCL2-CCR2. Sugerimos a hipótese de que poderão existir mais sinergias na combinação de diferentes imunoterapias que apresentem o TME como alvo.

Num tumor onde predomina a imunossupressão, é importante identificar com exatidão as causas e os efeitos desta mesma imunossupressão, com vista ao delineamento de novas estratégias. As MDSCs representam uma população de células indiferenciadas, definidas pelo seu impacto imunossupressor e pela sua interligação íntima com células Treg, igualmente imunossupressoras. A redução destes grupos celulares tem sido foco de interesse pela comunidade científica. A título de exemplo, a antagonização do CXCR4 poderá ser uma boa estratégia na diminuição do recrutamento de MDSCs, enquanto a inibição do eixo CCL5-CCR5 poderá ser uma boa estratégia na diminuição do recrutamento de células Treg. No entanto, também compreendemos que as células Treg, ao inibirem a resposta celular, inibem células T helper. Dito isto, num ambiente onde apurámos existir um predomínio de um padrão Th2, esse padrão sofrerá um aumento exponencial aquando da diminuição de células Treg.

Por este motivo, sugerimos a hipótese de existir um benefício maior na combinação de imunoterapias que visam diminuir os padrões de resposta Th2 e Th17, como por exemplo a neutralização de IL-6 e IL-17, ou que possibilitem diminuir o fenótipo instituído por estes padrões, como por exemplo TAMs e TANs, M2 e N2, respetivamente.

Pelo mesmo motivo, outra população que tem demonstrado grande interesse na comunidade científica é a de células dendríticas, pois não só representa uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, mas também representa o grupo celular que pode aumentar exponencialmente a resposta celular e, assim, aumentar a eliminação tumoral. No entanto, percebemos que esta população, ao contrário das outras abordadas neste trabalho, está em défice no microambiente tumoral. Acreditamos que utilização de agonistas *checkpoints*, como os agonistas anti-CD40, e de agonistas Flt3/Flt3L e possam representar uma boa estratégia num futuro muito próximo no aumento desta população.

Consideramos pertinente realçar o papel de duas citocinas inflamatórias cujo impacto foi possível apurar na maioria dos grupos celulares que abordámos neste artigo de revisão, nomeadamente a IL-6 e a IL-8 (CXCL8). Foi possível ao longo desta revisão constatar diversas relações com a IL-6: i) níveis aumentados estão reportados como respostas compensatórias ao tratamento com gemcitabina. ii) relação com os iCAFs; iii) relação com o aumento de células Treg. iv) a sua redução aquando da redução de TAMs. v) a sua neutralização aumentou o número de células dendríticas; vi) o seu aumento como resposta compensatória à utilização de agonistas CD40. Igualmente, foi possível identificar diversas relações com a IL-8: i) níveis aumentados estão reportados como resposta compensatória ao tratamento com gemcitabina. ii) níveis elevados no PDAC metastizado; iii) quer a inibição do eixo CXCL8-CXCR1/2, quer a utilização de um anticorpo anti-CXCL8 associado a gemcitabina diminuíram a proliferação de células PDAC. iv) o anticorpo anti-CXCL8 diminui o recrutamento de CAFs. Sugerimos assim que a neutralização destas citocinas, poderão ser uma mais valia.

Desta forma, verificámos que é importante ter uma visão ampla da “arquitetura” e “organização” deste microambiente, visto que a imunomodulação específica de um determinado grupo celular não só tem impacto na relação do TME com a neoplasia, como também poderá desencadear uma resposta compensatória indesejável que, quando detetada, poderá ser revertida, através da utilização e associação de diferentes imunoterapias.

Concluimos que a identificação de novos e diferentes imunomoduladores poderá desempenhar um papel importante na nova era da Imunoterapia, no que diz respeito ao combate das neoplasias pancreáticas. Por conseguinte, sublinhamos a possibilidade de existir um largo benefício entre a associação das imunoterapias que têm como alvo o TME. Terminamos inferindo que este possível benefício, associado ao facto destas novas terapias terem demonstrado um grande potencial efeito sinérgico com a quimiorradioterapia vigente e ainda associado à possibilidade de também sensibilizarem o tumor para a imunoterapia baseada em checkpoints, poderá mudar o paradigma atual que representa o adenocarcinoma ductal do pâncreas. O estudo do microambiente tumoral poderá vir a alterar o *outcome* dos doentes com PDAC. Espera-se, assim, que este artigo de revisão permita facilitar e incitar o desenvolvimento de futuros ensaios pré-clínicos.

AGRADECIMENTOS

Deixo por escrito o meu agradecimento ao Professor Doutor Rui Vasco Quintais Gradiz e à Professora Doutora Anabela Mota Pinto, meus professores e orientadores neste projeto, pela paciência, profissionalismo, disponibilidade e atenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7–30.
2. Karamitopoulou E. Tumour microenvironment of pancreatic cancer: immune landscape is dictated by molecular and histopathological features. *Br J Cancer* [Internet]. 2019;121(1):5–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-019-0479-5>
3. Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J Gastroenterol*. 2016;22(9):2678–700.
4. Padoan A, Plebani M, Basso D. Inflammation and pancreatic cancer: Focus on metabolism, cytokines, and immunity. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
5. Jameson, J., Kasper, D., Longo, D., Fauci, A., Hauser, S. and Loscalzo, J. *Harrison's Principles Of Internal Medicine*. 20th ed. McGraw-Hill Education; 2018. 591–595 p.
6. Mihaljevic AL, Michalski CW, Friess H, Kleeff J. Molecular mechanism of pancreatic cancer - Understanding proliferation, invasion, and metastasis [Internet]. Vol. 395, *Langenbeck's Archives of Surgery*. Langenbecks Arch Surg; 2010 [cited 2021 Mar 30]. p. 295–308. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20237938/>
7. Aichler M, Seiler C, Tost M, Siveke J, Mazur PK, Da Silva-Buttkus P, et al. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: A comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol* [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 Mar 30];226(5):723–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21984419/>
8. Kopp JL, von Figura G, Mayes E, Liu FF, Dubois CL, Morris JP, et al. Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2012 Dec 11 [cited 2021 Mar 30];22(6):737–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23201164/>
9. Hwang C Il, Boj SF, Clevers H, Tuveson DA. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma [Internet]. Vol. 238, *Journal of Pathology*. John Wiley and Sons Ltd; 2016 [cited 2021 Mar 30]. p. 197–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26419819/>
10. Basturk O, Hong SM, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin A V., et al. A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. In: *American Journal of Surgical Pathology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 1730–41.
11. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019

- WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020 Jan;76(2):182–8.
12. Kakar, S., Pawlik, T. M., Allen, P. J., Vauthey J. *AJCC Cancer Staging Manual, Exocrine Pancreas*. 2017. 337–347 p.
 13. Tempero MA, Malafa MP, Chair V, Asbun H, Behrman SW, Benson III AB, et al. *NCCN Guidelines Version 1.2015 Panel Members Pancreatic Adenocarcinoma NCCN Guidelines Panel Disclosures Continue*. 2014.
 14. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: The CONKO-001 randomized trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2013 Oct;310(14):1473–81.
 15. Inman KS, Francis AA, Murray NR. Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer [Internet]. Vol. 20, *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press; 2014 [cited 2021 Mar 30]. p. 11160–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25170202/>
 16. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011 Apr;29:235–71.
 17. CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS. In: *Immunology Guidebook*. Elsevier; 2004. p. 47–124.
 18. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*. 2015;195(10):4555–63.
 19. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression [Internet]. Vol. 32, *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2018 [cited 2021 Mar 30]. p. 1267–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30275043/>
 20. Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2019 [cited 2021 Mar 30]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31799175/>
 21. Jeong J, Suh Y, Jung K. Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. Vol. 10, *Frontiers in immunology*. NLM (Medline); 2019. p. 1817.
 22. Felix K, Gaida MM. Neutrophil-derived proteases in the microenvironment of pancreatic cancer –active players in tumor progression. *Int J Biol Sci*. 2016;12(3):302–13.

23. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas. *Acta Med Port.* 2011;24(SUPPL.4):967–76.
24. Awaji M, Saxena S, Wu L, Prajapati DR, Purohit A, Varney ML, et al. CXCR2 signaling promotes secretory cancer-associated fibroblasts in pancreatic ductal adenocarcinoma. *FASEB J* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Mar 30];34(7):9405–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32453916/>
25. Nywening TM, Belt BA, Cullinan DR, Panni RZ, Han BJ, Sanford DE, et al. Targeting both tumour-associated CXCR2+ neutrophils and CCR2+ macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 30];67(6):1112–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29196437/>
26. Wang Y, Fang T, Huang L, Wang H, Zhang L, Wang Z, et al. Neutrophils infiltrating pancreatic ductal adenocarcinoma indicate higher malignancy and worse prognosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jun;501(1):313–9.
27. Oberg HH, Wesch D, Kalyan S, Kabelitz D. Regulatory interactions between neutrophils, tumor cells and T Cells. *Front Immunol.* 2019;10(JULY).
28. Long KB, Collier AI, Beatty GL. Macrophages: Key orchestrators of a tumor microenvironment defined by therapeutic resistance. *Mol Immunol.* 2019 Jun;110:3–12.
29. Nielsen SR, Schmid MC. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/9624760>
30. Kurahara H, Shintchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* [Internet]. 2011 May 15 [cited 2021 Apr 2];167(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19765725/>
31. Karnevi E, Andersson R, Rosendahl AH. Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Apr 2];92(6):543–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24662521/>
32. Peng Y, Zhang J, Liang W, Tu M, Lu Z, Wei J, et al. Elevation of MMP-9 and IDO induced by pancreatic cancer cells mediates natural killer cell dysfunction. 2014;1–12.
33. Yang C, Cheng H, Zhang Y, Fan K, Luo G, Fan Z. Anergic natural killer cells educated by tumor cells are associated with a poor prognosis in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(12):1815–23.
34. Barilla RM, Diskin B, Caso RC, Lee KB, Mohan N, Buttar C, et al. Specialized dendritic cells induce tumor-promoting IL-10 + IL-17 + FoxP3 neg regulatory CD4 + T cells in pancreatic carcinoma. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Apr 2];10(1). Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30926808/>
35. Hegde S, Krisnawan VE, Herzog BH, Zuo C, Breden MA, Knolhoff BL, et al. Dendritic Cell Paucity Leads to Dysfunctional Immune Surveillance in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2020 Mar 16 [cited 2021 Mar 30];37(3):289-307.e9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32183949/>
 36. Lin JH, Huffman AP, Wattenberg MM, Walter DM, Carpenter EL, Feldser DM, et al. Type 1 conventional dendritic cells are systemically dysregulated early in pancreatic carcinogenesis. Vol. 217, *Journal of Experimental Medicine*. 2020.
 37. Zhang X, Shen L, Liu Q, Hou L, Huang L. Inhibiting PI3 kinase- γ in both myeloid and plasma cells remodels the suppressive tumor microenvironment in desmoplastic tumors. *J Control Release* [Internet]. 2019 Sep 10 [cited 2021 Mar 30];309:173–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31362079/>
 38. Shah DK, Zúñiga-pflücker JC. An Overview of the Intrathymic Intricacies of T Cell Development. 2014;
 39. Guéry L, Hugues S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity [Internet]. Vol. 2015, *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2015 [cited 2021 Mar 30]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26583099/>
 40. Tan MCB, Goedegebuure PS, Belt BA, Flaherty B, Sankpal N, Gillanders WE, et al. Disruption of CCR5-Dependent Homing of Regulatory T Cells Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer. *J Immunol*. 2009 Feb;182(3):1746–55.
 41. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. *J Immunol*. 2012 Dec;189(12):5602–11.
 42. Wang X, Lang M, Zhao T, Feng X, Zheng C, Huang C, et al. Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3+Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. 2017; Available from: www.nature.com/onc
 43. Zhang Y, Lazarus J, Steele NG, Yan W, Lee HJ, Nwosu ZC, et al. Regulatory T-cell depletion alters the tumor microenvironment and accelerates pancreatic carcinogenesis. *Cancer Discov*. 2020 Mar;10(3):422–39.
 44. He S, Fei M, Wu Y, Zheng D, Wan D, Wang L, et al. Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2011 Nov [cited 2021 Mar 30];12(11):7424–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22174607/>
 45. Sideras K, Braat H, Kwekkeboom J, van Eijck CH, Peppelenbosch MP, Sleijfer S, et al. Role

- of the immune system in pancreatic cancer progression and immune modulating treatment strategies. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2014;40(4):513–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.005>
46. Amedei A, Niccolai E, Prisco D. Pancreatic cancer: Role of the immune system in cancer progression and vaccine-based immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother*. 2014;10(11):3354–68.
 47. Lafaro KJ, Melstrom LG. The Paradoxical Web of Pancreatic Cancer Tumor Microenvironment. *Am J Pathol* [Internet]. 2019;189(1):44–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.09.009>
 48. Suzuki D, Furukawa K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, et al. Effects of perioperative immunonutrition on cell-mediated immunity, T helper type 1 (Th1)/Th2 differentiation, and Th17 response after pancreaticoduodenectomy. *Surgery*. 2010 Sep;148(3):573–81.
 49. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2011 Mar;208(3):469–78.
 50. Hopkins AC, Yarchoan M, Durham JN, Yusko EC, Rytlewski JA, Robins HS, et al. T cell receptor repertoire features associated with survival in immunotherapy-treated pancreatic ductal adenocarcinoma. *JCI insight*. 2018;3(13):1–10.
 51. Shima H, Tsurita G, Wada S, Hirohashi Y, Yasui H, Hayashi H, et al. Randomized phase II trial of survivin 2B peptide vaccination for patients with HLA-A24-positive pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 2019;110(8):2378–85.
 52. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment [Internet]. Vol. 18, *Clinical Cancer Research*. *Clin Cancer Res*; 2012 [cited 2021 Mar 30]. p. 4266–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22896693/>
 53. Iovanna JL, Closa D. Factors released by the tumor far microenvironment are decisive for pancreatic adenocarcinoma development and progression. *Oncoimmunology* [Internet]. 2017;6(11):1–4. Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1358840>
 54. Begum A, McMillan RH, Chang YT, Penchev VR, Rajeshkumar N V., Maitra A, et al. Direct Interactions with Cancer-Associated Fibroblasts Lead to Enhanced Pancreatic Cancer Stem Cell Function. *Pancreas* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Mar 30];48(3):329–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30747824/>
 55. Lee JJ, Perera RM, Wang H, Wu D-C, Liu S, Han S, et al. Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1411679111

56. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2014 Jun;25(6):735–47.
57. Hedgehog W, Inhibitors S. Stroma — A Double-Edged Sword in Pancreatic Cancer A Lesson From Targeting Stroma in Pancreatic Cancer. 2018;(81772566):382–9.
58. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*. 2014 Jun;25(6):719–34.
59. Gorchs L, Moro CF, Bankhead P, Kern KP, Sadeak I, Meng Q, et al. Human pancreatic carcinoma-associated fibroblasts promote expression of co-inhibitory markers on CD4+ and CD8+ T-cells. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 2];10(APR). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31068935/>
60. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvise M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2017 Mar;214(3):579–96.
61. Mizutani Y, Kobayashi H, Iida T, Asai N, Masamune A, Hara A, et al. Mefflin-positive cancer-associated fibroblasts inhibit pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res*. 2019 Oct;79(20):5367–81.
62. Gorchs L, Ahmed S, Mayer C, Knauf A, Fernández Moro C, Svensson M, et al. The vitamin D analogue calcipotriol promotes an anti-tumorigenic phenotype of human pancreatic CAFs but reduces T cell mediated immunity. *Sci Rep*. 2020 Dec;10(1).
63. Elyada E, Bolisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, Burkhart RA, et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts. Vol. 9, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2019. p. 1102–23.
64. Biffi G, Oni TE, Spielman B, Hao Y, Elyada E, Park Y, et al. Il1-induced Jak/STAT signaling is antagonized by TGFβ to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2019;9(2):282–301.
65. Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, Tzatsos A, Conrad C, Benes CH, et al. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res*. 2011 Jul;71(14):5020–9.
66. Yamasaki A, Kameda C, Xu R, Tanaka H, Tasaka T, Chikazawa N, et al. Nuclear factor kappaB-activated monocytes contribute to pancreatic cancer progression through the production of Shh. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2010 May [cited 2021 Apr 2];59(5):675–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19862523/>
67. Garg B, Giri B, Modi S, Sethi V, Castro I, Umland O, et al. NFκB in Pancreatic Stellate Cells

- Reduces Infiltration of Tumors by Cytotoxic T Cells and Killing of Cancer Cells, via Up-regulation of CXCL12. *Gastroenterology* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Feb 11];155(3):880-891.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29909021/>
68. Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells RJB, Deonarine A, Chan DS, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec;110(50):20212–7.
 69. Mitsunaga S, Ikeda M, Shimizu S, Ohno I, Furuse J, Inagaki M, et al. Serum levels of IL-6 and IL-1 β can predict the efficacy of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2013 May [cited 2021 Feb 11];108(10):2063–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23591198/>
 70. Zhang D, Li L, Jiang H, Li Q, Wang-Gillam A, Yu J, et al. Tumor–Stroma IL1b-IRAK4 feedforward circuitry drives tumor fibrosis, chemoresistance, and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2018 Apr;78(7):1700–12.
 71. Awaji M, Futakuchi M, Heavican T, Iqbal J, Singh RK. Cancer-Associated Fibroblasts Enhance Survival and Progression of the Aggressive Pancreatic Tumor Via FGF-2 and CXCL8. *Cancer Microenviron*. 2019 Apr;12(1):37–46.
 72. De Jesus-Acosta A, Sugar EA, O’Dwyer PJ, Ramanathan RK, Von Hoff DD, Rasheed Z, et al. Phase 2 study of vismodegib, a hedgehog inhibitor, combined with gemcitabine and nab-paclitaxel in patients with untreated metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2020 Feb;122(4):498–505.
 73. Hurwitz H, Van Cutsem E, Bendell J, Hidalgo M, Li CP, Salvo MG, et al. Ruxolitinib + capecitabine in advanced/metastatic pancreatic cancer after disease progression/intolerance to first-line therapy: JANUS 1 and 2 randomized phase III studies. *Invest New Drugs*. 2018 Aug;36(4):683–95.
 74. Ng K, Hendifar A, Starodub A, Chaves J, Yang Y, Koh B, et al. Phase 1 dose-escalation study of momelotinib, a Janus kinase 1/2 inhibitor, combined with gemcitabine and nab-paclitaxel in patients with previously untreated metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Invest New Drugs*. 2019 Feb;37(1):159–65.
 75. Murphy JE, Wo JY, Ryan DP, Clark JW, Jiang W, Yeap BY, et al. Total Neoadjuvant Therapy with FOLFIRINOX in Combination with Losartan Followed by Chemoradiotherapy for Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2019 Jul;5(7):1020–7.
 76. Losartan and Nivolumab in Combination With FOLFIRINOX and SBRT in Localized Pancreatic Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Mar 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03563248>

77. Biasci D, Smoragiewicz M, Connell CM, Wang Z, Gao Y, Thaventhiran JED, et al. CXCR4 inhibition in human pancreatic and colorectal cancers induces an integrated immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Nov;117(46):28960–70.
78. Inman KS, Francis AA, Murray NR. Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(32):11160–81.
79. Trovato R, Fiore A, Sartori S, Canè S, Giugno R, Cascione L, et al. Immunosuppression by monocytic myeloid-derived suppressor cells in patients with pancreatic ductal carcinoma is orchestrated by STAT3. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2019 Sep 18 [cited 2021 Mar 30];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31533831/>
80. Metzger P, Kirchleitner S V., Boehmer DFR, Hörth C, Eisele A, Ormanns S, et al. Systemic but not MDSC-specific IRF4 deficiency promotes an immunosuppressed tumor microenvironment in a murine pancreatic cancer model. *Cancer Immunol Immunother*. 2020 Oct;69(10):2101–12.
81. Christmas BJ, Rafie CI, Hopkins AC, Scott BA, Ma HS, Cruz KA, et al. Entinostat converts immune-resistant breast and pancreatic cancers into checkpoint-responsive tumors by reprogramming tumor-infiltrating MDSCs. *Cancer Immunol Res*. 2018 Dec;6(12):1561–77.
82. Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Oct;60(10):1419–30.
83. Siret C, Collignon A, Silvy F, Robert S, Cheyrol T, André P, et al. Deciphering the Crosstalk Between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jan 22 [cited 2021 Mar 30];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32038621/>
84. Huang H, Zepp M, Georges RB, Jarahian M, Kazemi M, Eyol E, et al. The CCR5 antagonist maraviroc causes remission of pancreatic cancer liver metastasis in nude rats based on cell cycle inhibition and apoptosis induction. *Cancer Lett*. 2020 Apr;474:82–93.
85. Fan K, Yang C, Fan Z, Huang Q, Zhang Y, Cheng H, et al. MUC16 C terminal-induced secretion of tumor-derived IL-6 contributes to tumor-associated Treg enrichment in pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2018 Apr;418:167–75.
86. Wang X, Li X, Wei X, Jiang H, Lan C, Yang S, et al. PD-L1 is a direct target of cancer-FOXP3 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and combined immunotherapy with antibodies against PD-L1 and CCL5 is effective in the treatment of PDAC. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Dec;5(1).
87. Trial of Neoadjuvant and Adjuvant Nivolumab and BMS-813160 With or Without GVAX for

- Locally Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Mar 30]. Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03767582>
88. BMS-813160 With Nivolumab and Gemcitabine and Nab-paclitaxel in Borderline Resectable and Locally Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Mar 30]. Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03496662>
89. Le DT, Wang-Gillam A, Picozzi V, Greten TF, Crocenzi T, Springett G, et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria monocytogenes*-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Apr 20 [cited 2021 Feb 22];33(12):1325–33. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25584002/>
90. Song J, Lee J, Kim J, Jo S, Kim YJ, Baek JE, et al. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) enhances the accumulation and functional activity of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug;7(32):51840–53.
91. Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, Hsieh CS, Lee HM, Herndon J, et al. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Sep;61(9):1373–85.
92. Bockorny B, Semenisty V, Macarulla T, Borazanci E, Wolpin BM, Stemmer SM, et al. BL-8040, a CXCR4 antagonist, in combination with pembrolizumab and chemotherapy for pancreatic cancer: the COMBAT trial. *Nat Med*. 2020 Jun;26(6):878–85.
93. Sanford DE, Porembka MR, Panni RZ, Mitchem JB, Belt BA, Plambeck-Suess SM, et al. A Study of Zoledronic Acid as Neo-Adjuvant, Perioperative Therapy in Patients with Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Cancer Ther*. 2013;04(03):797–803.
94. Stone ML, Beatty GL. Cellular determinants and therapeutic implications of inflammation in pancreatic cancer. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2019;201:202–13. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.012>
95. Bishehsari F, Zhang L, Barlass U, Preite NZ, Turturro S, Najor MS, et al. KRAS mutation and epithelial–macrophage interplay in pancreatic neoplastic transformation. *Int J Cancer*. 2018 Oct;143(8):1994–2007.
96. Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Mayer A, Deshpande AD, Carpenter D, et al. Human Cancer Biology Inflammatory Monocyte Mobilization Decreases Patient Survival in Pancreatic Cancer: A Role for Targeting the CCL2/CCR2 Axis. 2013; Available from:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/>
97. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, et al. CSF1/CSF1R

- blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* 2014 Jul;74(18):5057–69.
98. Candido JB, Morton JP, Bailey P, Campbell AD, Karim SA, Jamieson T, et al. CSF1R+ Macrophages Sustain Pancreatic Tumor Growth through T Cell Suppression and Maintenance of Key Gene Programs that Define the Squamous Subtype. *Cell Rep.* 2018 May;23(5):1448–60.
99. Saung MT, Muth S, Ding D, Thomas DL, Blair AB, Tsujikawa T, et al. Targeting myeloid-inflamed tumor with anti-CSF-1R antibody expands CD137+ effector T-cells in the murine model of pancreatic cancer. *J Immunother Cancer.* 2018 Nov;6(1).
100. Chen Q, Wang J, Zhang Q, Zhang J, Lou Y, Yang J, et al. Tumour cell-derived debris and IgG synergistically promote metastasis of pancreatic cancer by inducing inflammation via tumour-associated macrophages. *Br J Cancer.* 2019 Oct;121(9):786–95.
101. Nywening TM, Wang-Gillam A, Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Cusworth BM, et al. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: A single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Mar 30];17(5):651–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27055731/>
102. Noel M, O'Reilly EM, Wolpin BM, Ryan DP, Bullock AJ, Britten CD, et al. Phase 1b study of a small molecule antagonist of human chemokine (C-C motif) receptor 2 (PF-04136309) in combination with nab-paclitaxel/gemcitabine in first-line treatment of metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Invest New Drugs* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Mar 30];38(3):800–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31297636/>
103. Bausch D, Pausch T, Krauss T, Hopt UT, Fernandez-Del-Castillo C, Warshaw AL, et al. Neutrophil granulocyte derived MMP-9 is a VEGF independent functional component of the angiogenic switch in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Angiogenesis.* 2011 Sep;14(3):235–43.
104. Chao T, Furth EE, Vonderheide RH. CXCR2-dependent accumulation of tumor-associated neutrophils regulates T-cell immunity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2016 Nov;4(11):968–82.
105. Song Y, Baba T, Li YY, Furukawa K, Tanabe Y, Matsugo S, et al. Gemcitabine-induced CXCL8 expression counteracts its actions by inducing tumor neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar;458(2):341–6.
106. Fu S, Chen X, Lin HJ, Lin J. Inhibition of interleukin 8/C-X-C chemokine receptor 1/2 signaling reduces malignant features in human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2018

- Jul;53(1):349–57.
107. Steele CW, Karim SA, Leach JDG, Bailey P, Upstill-Goddard R, Rishi L, et al. CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2016 Jun;29(6):832–45.
 108. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep;16(3):183–94.
 109. Caisová V, Uher O, Nedbalová P, Jochmanová I, Kvardová K, Masáková K, et al. Effective cancer immunotherapy based on combination of TLR agonists with stimulation of phagocytosis. *Int Immunopharmacol*. 2018;59(October 2017):86–96.
 110. Brú A, Bosch R, Céspedes M V., Carmona-Güedes S, Pascual E, Brú I, et al. Antitumoral effect of maintained neutrophilia induced by rhG-CSF in a murine model of pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1).
 111. RP72 Monotherapy and in Combination With Gemcitabine in Patients With Pancreatic Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Mar 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04338763>
 112. Jang JE, Hajdu CH, Liot C, Miller G, Dustin ML, Bar-Sagi D. Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-tumor Immunity in Pancreatic Cancer. *Cell Rep* [Internet]. 2017 Jul 18 [cited 2021 Apr 2];20(3):558–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28723561/>
 113. Beatty GL, Torigian DA, Gabriela Chiorean E, Saboury B, Brothers A, Alavi A, et al. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Nov 15 [cited 2021 Mar 30];19(22):6286–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23983255/>
 114. O’Hara MH, O’Reilly EM, Varadhachary G, Wolff RA, Wainberg ZA, Ko AH, et al. CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M (sotigalimab) and chemotherapy, with or without nivolumab, for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: an open-label, multicentre, phase 1b study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Mar 30];22(1):118–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33387490/>
 115. Immunologic Effects of CDX-301 and CDX-1140 in Resectable Pancreatic Cancer Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Mar 5]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04536077>