

# **Hipóxia tumoral: contribuição para a progressão do cancro e o papel terapêutico de pró-fármacos ativados pela hipóxia**

Elena Sochirca

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Medicina  
(mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Alberto Fonseca Moutinho

maio de 2021

**Folha em branco**

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor José Alberto Fonseca Moutinho, pela sua disponibilidade e pela ajuda prestada durante a elaboração deste trabalho.

Aos meus pais, pelo amor e carinho incondicionais, pelo apoio e motivação nos momentos mais difíceis e, sobretudo, por acreditarem sempre em mim.

Às pessoas que me acompanharam durante este percurso, pela companhia e por todos os momentos inesquecíveis.

À Faculdade de Ciências da Saúde e à cidade da Covilhã, por me terem acolhido durante estes 6 anos e por me terem permitido crescer enquanto pessoa.

**Folha em branco**

## Resumo

Introdução: O cancro apresenta uma elevada taxa de incidência e de mortalidade, existindo a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O microambiente tumoral é muitas vezes caracterizado por uma baixa concentração de oxigénio, condição designada por hipóxia, que foi associada a um pior prognóstico e representa, desta forma, um importante alvo terapêutico.

Objetivos: Elaborar uma revisão de literatura sobre a hipóxia tumoral, no que toca à definição do conceito da hipóxia tumoral e dos seus fatores etiológicos, mecanismos celulares induzidos pela hipóxia tumoral e ainda sobre os pró-fármacos ativados pela hipóxia.

Materiais e métodos: Foi efetuada uma pesquisa de literatura referente ao tema utilizando as bases de dados PubMed e ClinicalTrials.gov.

Resultados: Hipóxia é definida como redução da disponibilidade de oxigénio e resulta da proliferação celular excessiva e da presença de uma rede vascular anormal, característicos de neoplasias malignas. Provoca a estabilização do fator de transcrição induzido pela hipóxia que, por sua vez, regula várias respostas celulares que permitem a adaptação e sobrevivência das células cancerígenas no microambiente hipóxico, entre as quais a glicólise e a metastização. É ainda responsável pela resistência à quimioterapia e radioterapia apresentada pelas células hipóxicas, o que motiva o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Os pró-fármacos ativados pela hipóxia são ativados e atuam preferencialmente em regiões hipóxicas dos tumores. Ao longo do tempo vários compostos foram sintetizados e alguns deles avaliados em ensaios clínicos.

Discussão: A literatura existente aponta para o papel da hipóxia tumoral na regulação de mecanismos celulares necessários para a progressão do cancro. Ao longo do tempo foram verificadas tentativas de melhorar as propriedades farmacológicas dos pró-fármacos ativados pela hipóxia. As limitações verificadas nos ensaios clínicos prendem-se com a possibilidade de ativação dos fármacos em tecidos normais e com a falta de estratificação dos doentes de acordo com os níveis de hipóxia apresentados pelos seus tumores. É necessário aguardar pelos resultados dos ensaios clínicos atualmente em fase ativa.

Conclusão e perspetivas futuras: Ainda nenhum pró-fármaco ativado pela hipóxia foi aprovado para uso clínico. É necessário otimizar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de modo a permitir uma melhor difusão para as regiões hipóxicas do tumor. Para além disso, é necessário estratificar os doentes de acordo com os seus níveis de hipóxia em futuros ensaios clínicos.

## **Palavras-chave**

Cancro; hipóxia tumoral; fator de transcrição induzido pela hipóxia; pró-fármacos ativados pela hipóxia; tratamento.

## Abstract

Introduction: Cancer has a high incidence and mortality rates, which results in a need for new treatment approaches. The tumour microenvironment is often characterized by a low oxygen concentration, a condition called hypoxia, associated with worse outcome; therefore, it represents an important therapeutic target.

Objectives: To elaborate a literature review regarding tumour hypoxia, specifically the definition of tumour hypoxia and its etiology, cellular mechanisms induced by hypoxia and regarding the hypoxia activated prodrugs.

Materials and methods: A literature search was done, using PubMed and ClinicalTrials.gov databases.

Results: Hypoxia is defined by reduced oxygen availability and is a result of excessive cellular proliferation and an abnormal vascular network often present in malignant tumours. It leads to the hypoxia inducible factor stabilization which, in turn, regulates cellular responses responsible for the adaptation and survival of cancer cells in the hypoxic microenvironment, such as glycolysis and metastasis. It is also responsible for the resistance to chemotherapy and radiotherapy of the hypoxic cells, which motivates the development of new therapeutic approaches. Hypoxia activated prodrugs are activated and act preferably in hypoxic regions of tumours. Over the time, multiple compounds were synthesized and evaluated in clinical trials.

Discussion: The existent literature indicates the importance of tumour hypoxia for the regulation of cellular responses needed for cancer progression. Over the time, there was a positive evolution of the pharmacologic properties of hypoxia activated prodrugs. The limitations encountered in clinical trials are the possible activation of hypoxia activated prodrugs in normal tissues and the absence of patient stratification according to hypoxia levels of their tumours. Results of the active clinical trials are awaited.

Conclusion and future perspectives: To this date, none of the hypoxia activated prodrugs has been approved for clinical use. It is necessary to optimize their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties for a better diffusion to the hypoxic regions of a tumour. Also, it is necessary to stratify the patients according to their hypoxia levels in future clinical trials.

## **Keywords**

Cancer; tumour hypoxia; hypoxia inducible factor; hypoxia activated prodrugs; treatment.

# Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Palavras-chave	vi
Abstract	vii
Keywords	viii
Lista de Figuras	xi
Lista de Acrónimos	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Materiais e Métodos	5
4. Resultados	7
4.1 Hipóxia tumoral	7
4.1.1 Definição do conceito de hipóxia tumoral	7
4.1.2 Fatores etiológicos da hipóxia tumoral	7
4.1.3 Mecanismos celulares induzidos pela hipóxia tumoral	9
4.1.3.1 Via do fator de transcrição induzido pela hipóxia	9
4.1.3.2 Glicólise	11
4.1.3.3 Metastização	11
4.1.3.4 Resistência à quimioterapia e radioterapia	13
4.1.4 Métodos de deteção da hipóxia tumoral	14
4.2 Pró-fármacos ativados pela hipóxia	15
4.2.1 Estrutura e mecanismo de ativação	15
4.2.2 Tirapazamine	17
4.2.3 Apaziquone	19
4.2.4 PR-104	21
4.2.5 AQ4N	22
4.2.6 Evofosfamida	24
4.2.7 Pró-fármacos ativados pela hipóxia em associação com embolização trans-arterial	26
4.2.8 Pró-fármacos ativados pela hipóxia com alvos moleculares	27
5. Discussão	29
6. Conclusão e perspetivas futuras	31
Referências bibliográficas	33
Anexos – Anexo 1, autorização para reprodução da Figura 1	41

**Folha em branco**

## **Lista de Figuras**

Figura 1 – Regulação de HIF por vários níveis de O<sub>2</sub>

Figura 2 – Mecanismo de ativação de HAPs

Figura 3 – Mecanismo de ativação de TPZ

Figura 4 – Mecanismo de ativação de EO9

Figura 5 – Mecanismo de ativação de PR-104

Figura 6 – Mecanismo de ativação de AQ4N

Figura 7 – Mecanismo de ativação de evofosfamida

**Folha em branco**

## Lista de Acrónimos

2-OG	2-oxoglutarato
AKR1C3	Aldo-cetoreductase 1C3
CA9	Anidrase carbónica 9
CO <sub>2</sub>	Molécula de dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e <sup>-</sup>	Elétron
FAZA	<sup>18</sup> F-Fluoroazomicina arabinósido
FDG	<sup>18</sup> F-Fluorodeoxiglicose
FIH	Fator inibidor do fator de transcrição induzido pela hipóxia
FMISO	<sup>18</sup> F-Fluoromisonidazol
GLUT	Transportador de glicose
H <sup>+</sup>	Ião hidrogénio
H <sub>2</sub> O	Molécula de água
HAP	Pró-fármaco ativado pela hipóxia ( <i>hypoxia activated prodrug</i> )
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ião bicarbonato
HER	Família de recetores do fator de crescimento epidermóide humano
HIF	Fator de transcrição induzido pela hipóxia ( <i>hypoxia inducible factor</i> )
mmHg	Milímetros de mercúrio
Na <sup>+</sup>	Ião sódio
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductase 1
O <sub>2</sub>	Molécula de oxigénio
PET	Tomografia por emissão de positrões
PHD	Prolil hidroxilase
pO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigénio
pVHL	Produto do gene von Hippel-Lindau
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
TAE	Embolização trans-arterial ( <i>transarterial embolization</i> )
TPZ	<i>Tirapazamine</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
µm	Micrómetro

**Folha em branco**

## 1. Introdução

Em 2020 foram diagnosticados cerca de 19.3 milhões de novos casos de cancro em todo o mundo, sendo esta entidade responsável por 10.0 milhões de óbitos no mesmo ano. Estima-se que em 2040 o número de novos casos seja de 28.4 milhões, prevendo-se uma subida de 47% em relação a 2020. O cancro é, desta forma, um problema de saúde pública e também um problema económico. (1) A eliminação de fatores de risco e implementação de estratégias preventivas podem prevenir cerca de 30-50% de casos oncológicos. Quando a doença já está estabelecida, a cura pode ser possível através de um diagnóstico precoce e tratamento apropriado. (2) A elevada taxa de incidência e de mortalidade do cancro são fatores que motivam a investigação de novas abordagens terapêuticas. (3)

São descritos 4 grandes avanços na área de Oncologia, no que respeita à carcinogénese e com implicações para o desenvolvimento de novas terapias: o reconhecimento do papel de oncogenes e de genes supressores tumorais para a carcinogénese; a dependência do tumor da formação de vasos sanguíneos para que ocorra o seu crescimento; a alteração do metabolismo das células cancerígenas, passando estas a utilizar como fonte de energia a glicólise em vez da fosforilação oxidativa e, por fim, a caracterização do microambiente tumoral, no qual existe baixa concentração de oxigénio ( $O_2$ ) na maioria dos tumores sólidos. (4)

O estado de reduzida disponibilidade celular de  $O_2$ , com pressão parcial de  $O_2$  ( $pO_2$ ) inferior ao normal, recebe a designação de hipóxia; anóxia, por sua vez, constitui a ausência completa de  $O_2$  ( $pO_2 = 0$  mmHg). (5) Verificou-se que muitos tumores malignos se desenvolvem num meio de  $pO_2$  inferior quando comparados aos seus tecidos de origem normais e áreas de hipóxia e/ou anóxia encontram-se presentes em até 50-60% de tumores sólidos localmente avançados. (5,6)

A redução do nível de  $O_2$  pode ser severa o suficiente ao ponto de induzir morte celular, ou pode ser indutora de alterações na expressão génica das células malignas, (4) especialmente através do fator induzido pela hipóxia 1 (HIF-1), um fator de transcrição heterodimérico composto pelas subunidades  $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) e  $\beta$  (HIF- $\beta$ ). (7) Existem 3 formas homólogas de HIF – HIF-1, HIF-2 e HIF-3 compostas pelas subunidades HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ , respetivamente. Existe apenas uma subunidade beta – HIF-1 $\beta$ , presente nas 3 formas de HIF. A expressão de HIF- $\alpha$  varia de acordo com os níveis de  $O_2$ , ao contrário de HIF- $\beta$  cuja expressão é independente de  $O_2$ . A função de HIF-1 e HIF-2 encontra-se mais amplamente estudada; pelo contrário, o conhecimento sobre HIF-3 é menos completo. Sabe-se ainda que HIF-1 tem uma expressão celular generalizada e HIF-2 e HIF-3 apresentam uma expressão mais restrita a certos tipos celulares. (8,9)

Verificou-se que existe um aumento de expressão de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  em múltiplos tipos de cancro, bem como em metástases e lesões pré-malignas. Pelo contrário, estes fatores de transcrição estão ausentes na maioria dos tecidos normais e em tumores benignos. (10,11) Foi também estabelecida a associação do aumento de expressão de HIF a um pior prognóstico em grande parte de neoplasias malignas. (6)

Desta forma, a hipóxia tumoral surge como um alvo terapêutico importante a ser considerado. Pró-fármacos ativados pela hipóxia (HAPs), também designados por fármacos bio-redutíveis, são compostos inativos em condições normais que necessitam de ativação enzimática para exercerem o seu efeito terapêutico. Esta ativação ocorre nas regiões de hipóxia, pelo que os HAPs têm a capacidade de atuar seletivamente nas células tumorais hipóxicas e por isso constituem uma oportunidade terapêutica promissora em estudo. (12)

## 2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho consistiu em efetuar uma pesquisa bibliográfica sobre a hipóxia tumoral, quanto a:

- Definição do conceito de hipóxia tumoral;
- Fatores etiológicos da hipóxia tumoral;
- Mecanismos celulares induzidos pela hipóxia tumoral, nomeadamente a ativação da via HIF, a glicólise, a metastização e ainda a resistência à quimioterapia e radioterapia;
- Métodos de deteção da hipóxia tumoral;
- Terapêuticas com HAPs, nomeadamente:
  - o Estrutura e mecanismo de ativação;
  - o Fármacos mais extensamente avaliados em ensaios clínicos, especificamente os seus mecanismos de ativação, efeitos adversos associados e eficácia anti-tumoral.

**Folha em branco**

### 3. Materiais e Métodos

A pesquisa foi efetuada na base de dados PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) entre Setembro de 2020 e Fevereiro de 2021, utilizando-se as seguintes palavras-chave:

- (“*tumor hypoxia*” OR “*tumour hypoxia*” OR “*cancer hypoxia*”) AND (“*hypoxia inducible factor\**” OR “*hif*” OR “*hif pathway*”) AND (“*tumor progression*” OR “*tumour progression*” OR “*cancer progression*” OR “*tumor growth*” OR “*tumour growth*” OR “*cancer growth*” OR “*clinical outcome*”)
- “*hypoxia activated drug\**” OR “*hypoxia activated prodrug\**” OR “*hypoxia activated therap\**” OR “*bioreductive drug\**” OR “*bioreductive prodrug\**” OR “*bioreductive therap\**”

Não foi imposta nenhuma limitação; de todo o tipo de artigos encontrados, procedeu-se à análise dos títulos e *abstracts* de modo a selecionar os mais relevantes, dando-se preferência aos mais recentes. Sempre que um artigo se encontrava indisponível no PubMed procedia-se à sua pesquisa em outras bases de dados, nomeadamente Science Direct, Research Gate, Google Scholar e B-on. Foram também analisadas as sugestões de artigos recomendados e as referências bibliográficas citadas consideradas pertinentes.

Para a pesquisa de ensaios clínicos foram consultadas as bases de dados PubMed (aplicando-se o filtro *Clinical Trials*) e ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>), utilizando-se as seguintes palavras-chave: “*evofosfamide*”, “*tirapazamine*”, “*apaziquone*”, “*AQ4N*”, “*PR-104*” e “*tarloxotinib*”. Foi dada preferência aos ensaios aleatorizados de fase 3 com amostras maiores. Os ensaios clínicos listados no ClinicalTrials.gov mencionados ao longo do presente trabalho encontram-se identificados pelo seu número identificador (NCTxxxxxxxx).

Foi ainda consultada a página eletrónica da Organização Mundial da Saúde (<https://www.who.int/>).

**Folha em branco**

## 4. Resultados

### 4.1 Hipóxia tumoral

#### 4.1.1 Definição do conceito de hipóxia tumoral

Hipóxia é o estado em que a disponibilidade de  $O_2$  é reduzida (com  $pO_2$  inferior ao normal) ao ponto de comprometer as funções biológicas de células, tecidos ou órgãos; anóxia define-se como a ausência completa de  $O_2$  ( $pO_2 = 0$  mmHg). (5)

O ar a uma pressão atmosférica normal tem uma  $pO_2$  de 21% (160 mmHg). À medida que respiramos e o  $O_2$  é transportado dos alvéolos respiratórios para os tecidos periféricos a sua concentração diminui progressivamente, variando entre 3,4 - 6,8% (26,0 - 51,6 mmHg) de acordo com o tecido. Estabeleceu-se o valor de 5% de  $O_2$  (38 mmHg) como sendo o mais comum nos tecidos periféricos. Verificou-se que nos tumores malignos a  $pO_2$  é inferior quando comparada com os tecidos de origem normais, com valores compreendidos entre 0,3 - 4,2% (2,0 - 32,0 mmHg). Quase todos os tumores apresentam uma  $pO_2$  abaixo de 2%, sendo os tumores de próstata e do pâncreas os mais hipóxicos. (13)

Regiões de hipóxia e/ou anóxia podem ser encontradas em até 50-60% de tumores sólidos localmente avançados e são distribuídas de forma heterogênea pela massa tumoral, podendo estar próximas a regiões com  $pO_2$  normal. (5,6)

#### 4.1.2 Fatores etiológicos da hipóxia tumoral

O aparecimento de áreas hipóxicas deve-se principalmente à expansão da massa tumoral, em que as células em proliferação consomem mais  $O_2$  do que o esperado, existindo ainda uma redução do aporte sanguíneo devido ao aumento da distância entre as células e os capilares. (14) A partir de uma distância de 100-200  $\mu m$ , que constitui o limite de difusão de  $O_2$ , as células deixam de receber  $O_2$  e nutrientes suficientes para o seu crescimento. (15)

Numa tentativa de aumentar o aporte de  $O_2$  as células tumorais estimulam a angiogénese, um processo responsável pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir da rede vascular já existente. (14) Praticamente todos os fatores de crescimento que participam na angiogénese são induzidos por HIF-1, nomeadamente o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), angiopoietinas 1 e 2, fator de crescimento

placentário, fator de crescimento B derivado de plaquetas, fator 1 derivado do estroma, fatores de células estaminais, entre outros, e também os seus recetores associados. (16,17) Os membros da família VEGF e angiopoietinas têm um papel central na angiogénese no cancro. (14,15) Ao ligarem-se aos recetores expressos na superfície de células vasculares, estes fatores estimulam a formação de novos vasos sanguíneos na massa tumoral. (16)

No entanto, os vasos formados em resposta à hipoxia são anormais no que toca à sua estrutura e funcionalidade. A rede vascular do tumor é desorganizada e ramificada, composta por vasos dilatados, com diâmetros irregulares e permeabilidade aumentada devido à presença de fenestrações, junções intercelulares pouco coesas e membrana basal ausente ou descontínua. O resultado é um fluxo sanguíneo irregular que perpetua a existência de regiões hipóxicas. (15) Para além disso, a angiogénese permite a proliferação de células próximas aos vasos, levando ao aumento do consumo de  $O_2$  por estas células e, conseqüentemente, ao agravamento da hipóxia; é estabelecido um ciclo vicioso caracterizado pela manutenção de um ambiente altamente hipóxico apesar do excesso de angiogénese. (18)

Assim, a vasculatura do tumor falha em cumprir o seu objetivo principal de fornecimento de  $O_2$  – são descritos níveis heterogéneos de  $O_2$ , existindo perfusão das células localizadas na proximidade dos vasos sanguíneos e hipóxia nas regiões mais distantes. Por outro lado, pelo facto de os vasos serem estruturalmente anormais, pela drenagem linfática praticamente inexistente e pelo aumento da pressão intersticial, os vasos podem também sofrer colapsos intermitentes, provocando hipóxia nas células mais próximas. (13) Desta forma, são definidos 3 tipos de hipóxia - esta pode ser classificada como aguda ou limitada pela perfusão quando resulta do colapso de pequenos vasos ou do fluxo sanguíneo irregular, com duração de minutos a horas; quando os períodos transitórios de hipóxia são seguidos por períodos de reoxigenação poderá ser chamada de hipóxia cíclica ou intermitente; ou então como hipóxia crónica ou limitada pela difusão, secundária à contínua fraca difusão de  $O_2$  para locais mais distantes, com duração superior a 24 horas. (19)

#### 4.1.3 Mecanismos celulares induzidos pela hipóxia

Dependendo da duração e da gravidade da hipóxia, esta pode ser responsável pela inibição da proliferação celular e consequente morte celular por apoptose ou necrose ou, pelo contrário, pode ser o estímulo que permite a sobrevivência das células no ambiente desfavorável em que se encontram. A hipóxia e o sistema HIF têm a capacidade de alterar a expressão génica e proteica de modo a conferir uma vantagem adaptativa às células cancerígenas e exercer, desta forma, uma seleção de células resistentes à morte celular e promover a progressão tumoral. (4,6)

##### 4.1.3.1 Via do fator de transcrição induzido pela hipóxia

Quando os níveis de  $O_2$  estão dentro da normalidade, as subunidades HIF- $\alpha$  normalmente produzidas pelas células são destruídas – este processo envolve o seu reconhecimento pelo produto do gene supressor tumoral von Hippel-Lindau (pVHL) e ligação ao complexo de E3 ubiquitina ligase cuja função consiste em adicionar ubiquitina, marcando desta forma HIF- $\alpha$  para degradação. De modo a serem reconhecidas por pVHL, as subunidades HIF- $\alpha$  passam por uma reação de hidroxilação catalizada pelas enzimas prolinas hidroxilases (PHD). (20)

As PHD são membros da família de dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato (2-OG). Existem 3 formas de PHD – PHD1, PHD2 e PHD3, sendo a PHD2 a mais abundante e considerada o regulador primário de HIF-1 $\alpha$ . Estas enzimas utilizam  $O_2$  e 2-OG como substratos, podendo ainda necessitar de ferro e ascorbato. Na presença de  $O_2$ , PHD catalisa a reação de hidroxilação de resíduos de prolina no domínio de degradação dependente de  $O_2$  de HIF- $\alpha$  – mais especificamente de resíduos Pro402 e Pro564 em HIF-1 $\alpha$ , Pro405 e Pro531 em HIF-2 $\alpha$  e Pro492 em HIF-3 $\alpha$ . (8,9) Um átomo de oxigénio é utilizado na descarboxilação oxidativa de 2-OG de modo a originar succinato e dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e outro átomo é incorporado nos resíduos de prolina descritos anteriormente. A presença de  $O_2$  para esta reação é essencial, não podendo ser substituído pela molécula de água ( $H_2O$ ) – por esta razão, as enzimas PHD são consideradas como verdadeiros sensores de  $O_2$ . (21)

Uma segunda reação de hidroxilação assegura que HIF é degradado se os níveis de  $O_2$  forem suficientes. O fator inibidor de HIF (FIH), também uma enzima hidroxilase, adiciona um grupo hidroxilo ao resíduo de asparagina – Asn803 no caso de HIF-1 $\alpha$  e Asn851 no caso de HIF-2 $\alpha$ . Estes resíduos hidroxilados bloqueiam a ligação de HIF aos

coativadores transcripcionais *p300/CREB binding protein* necessários para iniciar a transcrição de genes alvo. (8)

Na presença da hipóxia as reações de hidroxilação catalisadas por PHD e FIH não ocorrem pela ausência de  $O_2$ , ficando a subunidade HIF- $\alpha$  protegida da degradação. Neste caso, HIF- $\alpha$  transloca-se para o núcleo e juntamente com HIF- $\beta$  forma o HIF ativo; por fim, este liga-se aos coativadores e inicia a transcrição de genes alvo. (8)

HIF ativa a transcrição de múltiplos genes alvo responsáveis pela eritropoiese, angiogénese, remodelação tecidual e cicatrização, que em células normais têm a função de garantir a adaptação e sobrevivência em ambientes pobres em  $O_2$ . No entanto, HIF pode ter um papel na adaptação de células tumorais ao ambiente hipóxico desfavorável ao regular respostas como a proliferação celular, angiogénese, alteração das vias metabólicas celulares, inibição da apoptose, metastização e ainda resistência à radioterapia (RT) e quimioterapia (QT). (8,9)

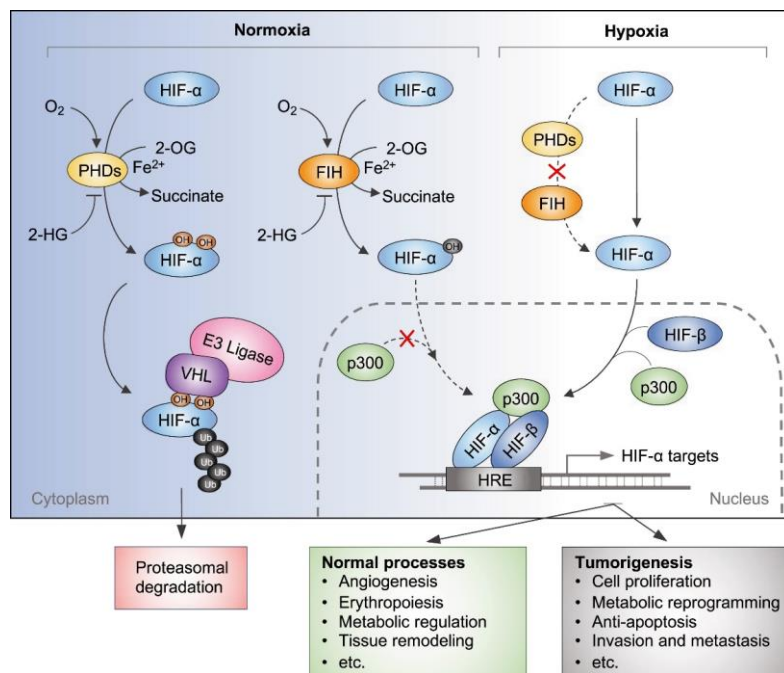


Figura 1: Regulação de HIF por vários níveis de  $O_2$ . Reproduzido com permissão de (8), em anexo. HRE: elementos de resposta à hipóxia; 2-HG: 2-hidroxiglutarato

A via HIF pode também ser ativada por mecanismos independentes da hipóxia, nomeadamente por mutações com perda de função de genes supressores tumorais, mutações com ganho de função de oncogenes e ainda em resposta a determinadas citocinas e fatores de crescimento. (18)

#### 4.1.3.2 Glicólise

Em condições normais as células realizam a fosforilação oxidativa mitocondrial para obtenção de energia – a glicose é metabolizada em piruvato e depois em acetil coenzima A, que posteriormente é metabolizada formando-se adenosina trifosfato necessária para as funções celulares; neste processo, o O<sub>2</sub> funciona como o aceitador final de eletrões. (22,23) Na ausência de O<sub>2</sub> são induzidos mecanismos de forma a compensar esta falta, nomeadamente a redução do número de células consumidoras de O<sub>2</sub> através da redução da proliferação celular e também a redução do consumo de O<sub>2</sub> por cada célula, através da realização da glicólise independente de O<sub>2</sub> em vez da fosforilação oxidativa. O microambiente tumoral é, desta forma, heterogéneo – as células próximas aos vasos sanguíneos realizam a fosforilação oxidativa e as células hipóxicas são dependentes da glicólise anaeróbia. (22)

HIF-1 induz a expressão das enzimas necessárias para o processo de glicólise. Em primeiro lugar, são expressos os transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3 que permitem a sua entrada em grande quantidade nas células. O aumento do consumo da glicose nas células tumorais constitui o fundamento para a utilização de <sup>18</sup>F-Fluorodeoxiglicose (FDG) na obtenção de imagens por tomografia por emissão de positrões (PET) para a pesquisa de metástases ocultas. (23) São ainda expressas as enzimas glicolíticas que levam à formação do piruvato, mas ao contrário do que acontece nas células ricas em O<sub>2</sub>, é inibida a enzima piruvato desidrogenase responsável pela formação da acetil coenzima A a partir do piruvato; em vez disso, atua a enzima lactato desidrogenase A que converte o piruvato em lactato, o produto final da glicólise. (22)

A glicólise provoca uma acumulação de lactato e de iões H<sup>+</sup> na célula, o que compromete as suas funções e pode levar à morte celular. (24) HIF expressa proteínas responsáveis pela sua saída da célula para o meio extracelular, nomeadamente o transportador monocarboxilato 4 que provoca o efluxo de lactato, bomba Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que permite a saída de H<sup>+</sup> e ainda a anidrase carbónica 9 (CA9) que converte CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O a H<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e contribui para o efluxo de H<sup>+</sup>. O resultado é a acidificação do meio extracelular, que tem um papel importante na invasão tumoral. (22)

#### 4.1.3.3 Metastização

A metastização é um processo complexo através do qual as células tumorais se disseminam a partir do tumor primário para outros locais anatómicos, constituindo tumores secundários; a doença disseminada é a causa de morte mais frequente em

doentes oncológicos. (25) O processo de metastização envolve vários passos: em primeiro lugar ocorre a transição epitélio-mesenquimatosa, em que as células tumorais perdem as características epiteliais através da perda de polaridade celular e da disrupção de ligações intercelulares com células adjacentes e adquirem características mesenquimatosas, nomeadamente a capacidade migratória e de invasão; posteriormente, as células tumorais degradam e invadem a membrana basal e a matriz extracelular que separam o tumor primário dos tecidos circundantes, dirigindo-se em direção aos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. Depois de alcançarem um vaso as células conseguem migrar para um local distante do tumor primário; por fim, saem do vaso e com o auxílio da angiogénese estabelecem o tumor secundário no local novo. (26,27)

A hipóxia e HIF são responsáveis pela expressão de moléculas necessárias para os vários passos do processo metastático. Promovem a transição epitélio-mesenquimatosa por meio da inibição da expressão da E-caderina, um componente de junções de adesão intercelulares com função supressora de invasão e metastização; em vez da E-caderina, as células passam a expressar as proteínas mesenquimatosas como N-caderina, vimentina e fibronectina que promovem a migração celular pela matriz extracelular. HIF induz a expressão de fatores de transcrição responsáveis pela transição epitélio-mesenquimatosa, nomeadamente SNAIL1-2, TWIST1-2, ZEB1-2, entre outros. (26,27)

A invasão da membrana basal e da matriz extracelular ocorre por meio da degradação das suas proteínas constituintes com o auxílio de enzimas proteolíticas, nomeadamente o ativador de plasminogénio tipo urocinase controlado por HIF-1 que converte plasminogénio em plasmina; a plasmina, por sua vez, degrada os componentes da matriz extracelular e ainda ativa os fatores de crescimento e enzimas metaloproteinases que também contribuem para o processo de degradação. (26)

Após a aquisição do fenótipo móvel e promotor da degradação da membrana basal e da matriz extracelular, as células tumorais migram em direção aos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. A angiogénese previamente estimulada no tumor por VEGF em resposta à hipóxia está diretamente relacionada com a metastização, pois cada novo vaso formado é uma via que as células tumorais podem usar para se disseminar. A entrada e a saída das células tumorais da rede vascular envolvem a degradação da membrana basal vascular pelas enzimas proteolíticas e é facilitada pela estrutura anormal dos vasos, pela presença de fenestrações e permeabilidade vascular aumentada. (25,26) Apenas uma pequena percentagem de células tumorais que atingem a circulação são capazes de formar metástases, sendo que a maioria permanece num estado latente. O estabelecimento e a proliferação do tumor secundário dependerão da formação de novos vasos no local da implantação pela ação de VEGF. (26)

#### 4.1.3.4 Resistência à quimioterapia e radioterapia

A cirurgia, a QT e a RT constituem as principais modalidades terapêuticas em Oncologia. É comum verificar-se uma ausência de resposta ao tratamento em muitos doentes, sendo a resistência à QT e/ou RT considerada a razão principal da falência terapêutica. As causas da resistência são multifatoriais, com uma grande contribuição da hipóxia tumoral e de HIF-1 $\alpha$ . (28)

A RT e alguns agentes da QT necessitam de O<sub>2</sub> para exercer o seu efeito citotóxico. (29,30) No caso da radiação ionizante, esta induz quebras nas cadeias de ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio da produção de radicais livres - a lesão no DNA torna-se permanente com a oxidação provocada pelos radicais de O<sub>2</sub>, sendo que sua ausência a lesão passa por um processo de reparação e é restaurada a estrutura original do DNA. Assim, as lesões induzidas nas cadeias de DNA pela RT são menos pronunciadas em caso de hipóxia. (31) As células tornam-se menos sensíveis à RT com pO<sub>2</sub> inferior a 2,6% (20 mmHg), especialmente com valores inferiores a 0,5% (3 mmHg). (13)

Tanto a QT como a RT provocam lesões no DNA que levam à morte celular. HIF-1 $\alpha$  tem a capacidade de iniciar a via de reparação das lesões no DNA provocadas pelo tratamento, bem como de induzir autofagia e de inibir a apoptose; o resultado final é a sobrevivência das células após a agressão. (28) É responsável também pela paragem do ciclo celular e redução da proliferação – a QT e RT atuam preferencialmente nas células em proliferação, enquanto a presença de células hipóxicas quiescentes contribui para a resistência. (29,32)

No caso da QT, a vascularização disfuncional e o aumento da distância entre os vasos sanguíneos e as células são fatores que afetam negativamente a distribuição dos fármacos; a acidez associada ao microambiente tumoral, por sua vez, é responsável por diminuir a entrada de alguns fármacos para o interior das células, como é o caso da doxorrubicina e da vincristina. (30) Por outro lado, HIF-1 é responsável pela ativação do gene *multidrug resistance 1* que codifica uma glicoproteína P membranar que atua como uma bomba de efluxo e reduz a concentração intracelular de vários agentes farmacológicos. *Multidrug resistance associated protein 1* é um outro transportador envolvido na resistência à QT. (32) Em termos gerais, HIF-1 promove resistência aos agentes da QT; no entanto, existem casos isolados em que a hipóxia contribui para o aumento da sensibilidade celular. (32,33)

Hipóxia e HIF-1 $\alpha$  têm um papel importante na resistência aos tratamentos atualmente utilizados na Oncologia, tornando-se cada vez mais importante o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. (28)

#### 4.1.4 Métodos de deteção da hipóxia tumoral

Inicialmente a hipóxia tumoral era detetada através de microeléctrodos inseridos diretamente no tumor, obtendo-se as medições de  $pO_2$ . No entanto, este método apresenta muitas limitações, entre as quais o facto de ser invasivo e de poder ser aplicado apenas em tumores acessíveis; para além disso, não distingue as áreas hipóxicas de áreas necróticas. (3,34)

Posteriormente passaram a ser utilizados os marcadores endógenos da hipóxia – consistem em proteínas cuja expressão é induzida por HIF-1 e encontram-se assim aumentadas na hipóxia, como é o caso do próprio HIF, da CA9 e do GLUT1. É possível avaliar a expressão destas proteínas através da imunohistoquímica e verificou-se que a expressão elevada destes marcadores está associada a um pior prognóstico em certos tipos de cancro; no entanto, nenhum marcador isolado fornece informação suficiente sobre o estado de hipóxia de um tumor, pelo que devem ser utilizadas combinações de múltiplos marcadores. Marcadores exógenos incluem os compostos 2-nitroimidazol, como por exemplo o pimonidazol. Após a sua administração, passam por uma reação de redução na ausência de  $O_2$  e ligam-se preferencialmente às macromoléculas das células hipóxicas; posteriormente esta ligação é identificada por imunohistoquímica. Estas técnicas encontram-se limitadas pela necessidade de realização de biópsias. (3,34)

Métodos imagiológicos não invasivos de deteção da hipóxia incluem a ressonância magnética e PET. Os compostos de 2-nitroimidazol podem ser marcados com flúor-18 de modo a serem utilizados em associação com PET. O primeiro marcador desenvolvido e o mais extensamente estudado é o  $^{18}F$ -Fluoromisonidazol (FMISO), sendo posteriormente criados outros nomeadamente  $^{18}F$ -Fluoroazomicina arabinósido (FAZA), entre outros. (3,34)

Cada método de medição de hipóxia não está isento de desvantagens, pelo que provavelmente é necessário empregar uma combinação de técnicas de modo a permitir uma melhor caracterização da hipóxia tumoral. (34)

## 4.2 Pró-fármacos ativados pela hipóxia

HAPs são compostos inativos em condições normais que são ativados por enzimas oxidoreduzases e exercem o seu efeito terapêutico em zonas de hipóxia. O conceito surgiu na década de 1970, tendo por base os trabalhos realizados sobre os derivados de mitomicina C. Nos estudos *in vitro* verificou-se que mitomicina C apresentou uma maior atividade nas células hipóxicas em comparação com células normais; no entanto, este efeito era fraco, motivando o desenvolvimento de novos fármacos com maior atividade em hipóxia. (3,12)

### 4.2.1 Estrutura e mecanismo de ativação

Em termos estruturais, um HAP é composto por 3 componentes: um “*trigger*”, um “*effector*” e um “*linker*” que faz a ligação entre os dois componentes anteriores. O “*trigger*” determina a ativação do HAP no ambiente hipóxico – é o componente que sofre reações de redução mediadas por oxidoreduzases de 1 eletrão ( $1e^-$ ) ou de 2 eletrões ( $2e^-$ ), libertando ou ativando o “*effector*”. O “*effector*”, na maioria das vezes, é um agente citotóxico que interage com o DNA das células tumorais e provoca lesões nas células hipóxicas. (12) Encontram-se descritas 5 entidades químicas com a capacidade de serem reduzidas em hipóxia, o que as torna adequadas para constituírem o “*trigger*” do HAP: compostos nitro (hetero)-cíclicos, N-óxidos aromáticos, N-óxidos alifáticos, quinonas e complexos de metais de transição. (12,35)

No que toca ao mecanismo de ativação: em primeiro lugar forma-se um radical do HAP via redução com adição de  $1e^-$ . Se a célula possuir uma quantidade suficiente de  $O_2$  ocorre a reação inversa à anterior, voltando a existir o HAP inativo e formando-se radicais superóxido como produto da reação. Na ausência de  $O_2$  o radical formado sofre reações subsequentes até formar o fármaco ativo. (12)

A redução com adição de  $2e^-$  permite uma passagem direta do HAP inativo para o fármaco ativo, contornando desta forma a formação do radical intermediário sensível a  $O_2$ . Os fármacos ativados por esta via insensível ao  $O_2$  são capazes de atuar tanto nas células hipóxicas como nas ricas em  $O_2$ . (12)

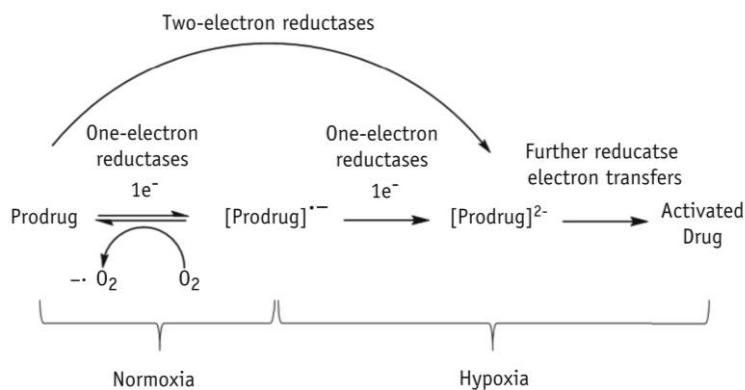


Figura 2: Mecanismo de ativação de HAPs. Retirado de (3), um artigo open access (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

A maioria das redutases de 1e<sup>-</sup> são flavoproteínas dependentes de NAD(P)H. Redutases de 2e<sup>-</sup> compreendem as hemoproteínas, que apesar de não gerarem intermediários sensíveis a O<sub>2</sub> conseguem ser inibidas pelo O<sub>2</sub>, e um outro grupo de redutases que não formam o intermediário nem são inibidas pelo O<sub>2</sub>, como é o caso da NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e da aldo-cetoreductase 1C3 (AKR1C3). (12,33)

Assim, a seletividade do mecanismo de ativação de HAPs em regiões de hipóxia é determinada pela reversão ou inibição do processo de ativação pelo O<sub>2</sub> e, nos casos em que o fármaco é ativado através da redução de 2e<sup>-</sup> insensível ao O<sub>2</sub> pela presença de elevados níveis de oxidoreductases responsáveis pela ativação no microambiente tumoral. (12)

Idealmente, um HAP deve ser capaz de se difundir para o tumor a partir de um vaso sanguíneo e de sofrer a reação de redução apenas na presença de hipóxia, evitando-se a sua ativação em tecidos normais. A espécie citotóxica resultante deve ser potente e capaz de eliminar as células tumorais, especialmente as células quiescentes e resistentes às outras modalidades terapêuticas; deverá ainda ser capaz de se difundir e exercer a sua ação nas células tumorais adjacentes com maior teor de O<sub>2</sub> (efeito “*bystander*”). (12,35) Assim, a QT e RT que, por norma, atuam nas células ricas em O<sub>2</sub> poderão ser complementadas com HAPs que têm como alvo as células hipóxicas resistentes. (3,12)

Ao longo do tempo verificou-se uma evolução no desenvolvimento de HAPs, sendo criados e avaliados vários fármacos tanto em modelos pré-clínicos como em modelos clínicos. De seguida serão apresentados 5 fármacos mais extensamente avaliados em ensaios clínicos. (12)

#### 4.2.2 Tirapazamine

*Tirapazamine* (TPZ) faz parte dos N-óxidos aromáticos; foi desenvolvido na década de 1980 e começou a ser avaliado em ensaios clínicos na década de 1990. Sofre redução por redutases de  $1e^-$  formando um radical intermediário que, na ausência de  $O_2$ , é transformado em radicais hidroxil e benzotriazinil responsáveis pelas lesões no DNA. Também pode sofrer redução com adição de  $2e^-$  por enzimas como NQO1, mas neste caso o metabolito formado tem uma atividade citotóxica reduzida (TPZ mono-N-óxido). (12)

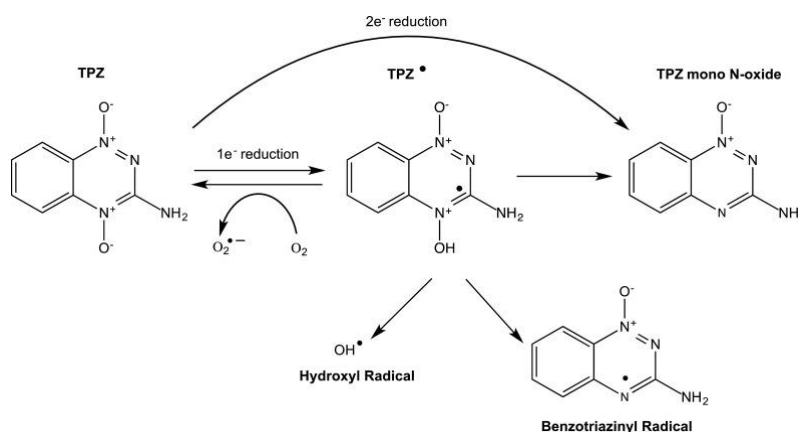


Figura 3: Mecanismo de ativação de TPZ. Retirado de (12), um artigo *open access* (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Nos ensaios clínicos o fármaco era administrado por via intravenosa, normalmente em associação com QT e/ou RT. Dos efeitos adversos relacionados com o fármaco destacam-se a perda auditiva de início agudo reversível, espasmos musculares intermitentes reversíveis, distúrbios visuais como, por exemplo, visão turva e redução da acuidade visual, fadiga, diarreia, náuseas e vômitos. (36) Foram ainda reportados casos de anemia, neutropenia, leucopenia e anormalidades da função hepática e renal. (37)

Um estudo aleatorizado de fase 3 em 446 doentes com cancro de pulmão de não pequenas células avaliou a combinação de TPZ com cisplatina em comparação com administração isolada de cisplatina. Verificou-se um aumento na sobrevida média (34,6 semanas no grupo experimental e 27,7 semanas no grupo controlo), bem como da taxa de resposta do tumor ao tratamento (27,5% no grupo experimental e 13,7% no grupo controlo) e da sobrevida ao fim de 1 ano (33,9% no grupo experimental e 22,5% no grupo controlo), concluindo-se que a adição de TPZ melhora a eficácia de cisplatina. (36)

Apesar deste resultado promissor, vários ensaios de fase 3 subsequentes não demonstraram o benefício do fármaco. Em 367 doentes com cancro de pulmão de não pequenas células, a associação de TPZ com paclitaxel e carboplatina não evidenciou

melhoria na taxa de resposta, no intervalo livre de doença (5 meses para os grupos experimental e controlo) e na sobrevivência geral (9 meses para os grupos experimental e controlo). Para além disso, verificou-se que a adição do fármaco aumentou substancialmente a toxicidade terapêutica. No entanto, estas conclusões foram limitadas pelo facto de o estudo ter terminado mais cedo do que o previsto por se ter verificado que os objetivos estabelecidos não iam ser atingidos. (38)

Em 402 doentes com cancro do colo do útero a associação de TPZ com cisplatina e RT não foi superior ao tratamento *standard*, com intervalo livre de doença e sobrevivência geral ao fim de 3 anos semelhantes nos 2 grupos (intervalo livre de doença de 63% no grupo experimental e 64,4% no grupo controlo; sobrevivência geral de 70,5% no grupo experimental e 70,6% no grupo controlo). Os dados encontram-se limitados pelo facto de o estudo ter terminado precocemente por falta de fármaco. (37)

Em 861 doentes com carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço foi avaliada a associação de TPZ com cisplatina e RT. Não foram verificadas diferenças no intervalo livre de doença e na sobrevivência geral ao fim de 2 anos (intervalo livre de doença de 56% no grupo experimental e 57% no grupo controlo; sobrevivência geral de 66,2% no grupo experimental e 65,7% no grupo controlo). (39)

Ao longos dos vários ensaios com TPZ foram feitas tentativas de identificar um biomarcador que estivesse associado com hipóxia. A osteopontina é uma fosfoglicoproteína associada a múltiplos tipos de cancro, mas também a inflamação, doença renal, doença cardíaca isquémica e remodelação óssea. (40) Um estudo verificou que doentes com níveis séricos mais baixos de osteopontina antes do tratamento apresentaram intervalo livre de doença, sobrevivência geral e taxa de resposta ao tratamento mais favoráveis (41); no entanto, uma avaliação subsequente noutra grupo de doentes não demonstrou nenhuma associação entre os níveis de osteopontina e o prognóstico. (40) Da mesma forma, não foi demonstrada associação entre os níveis de VEGF ou do inibidor do ativador de plasminogénio 1, normalmente aumentados na hipóxia, com o prognóstico. (41)

Em alguns estudos foi também utilizado FMISO-PET para deteção de regiões hipóxicas antes e ao longo do tratamento, nomeadamente num ensaio de fase 1 de doentes com carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, onde a hipóxia foi detetada em quase todos os doentes antes do tratamento e apenas em 1 doente no final do tratamento (42); e num outro ensaio de fase 2 da mesma entidade clínica, onde a hipóxia também foi identificada na maioria dos doentes, tendo-se verificado a sua associação com elevado risco de recorrência loco-regional do tumor. (43)

Verificou-se que TPZ apresenta algumas limitações no que toca às suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas que possam ter contribuído para os resultados

negativos dos ensaios clínicos. O fármaco é ativado em regiões de hipóxia moderada podendo ser ativado em tecidos normais que sejam fisiologicamente hipóxicos, como é o caso da medula óssea, e é rapidamente metabolizado, pelo que não chega a atuar nas regiões com hipóxia mais acentuada. (12,44) Na tentativa de melhorar as propriedades de difusão foram criados vários análogos do fármaco, entre os quais SN30000, também conhecido por CEN-209; no entanto, nenhum deles prosseguiu para avaliação em ensaios clínicos. (12,34)

#### 4.2.3 Apaziquone

*Apaziquone*, também conhecido por EO9, é um composto indolequinona derivado da mitomicina C sintetizado em 1987. É ativado por redução mediada tanto por oxidoredutases de  $1e^-$  como de  $2e^-$  (mediada por NQO1). (12)

A redução com  $1e^-$  gera um radical semi-quinona que, na ausência de  $O_2$  é estabilizado ou sofre uma redução subsequente formando uma hidroquinona, sendo que ambas as espécies resultantes atuam no DNA. Esta via de ativação restrita a zonas de hipóxia predomina em células com baixa expressão ou ausência de NQO1. Nas células com elevada expressão de NQO1 predomina a redução com adição de  $2e^-$ , contornando assim a formação da semi-quinona sensível a  $O_2$  e podendo existir a ativação do fármaco tanto nas células hipóxicas como nas ricas em  $O_2$ . Neste caso, a seletividade pela hipóxia dependerá da presença de níveis elevados de NQO1 no tumor. (12)

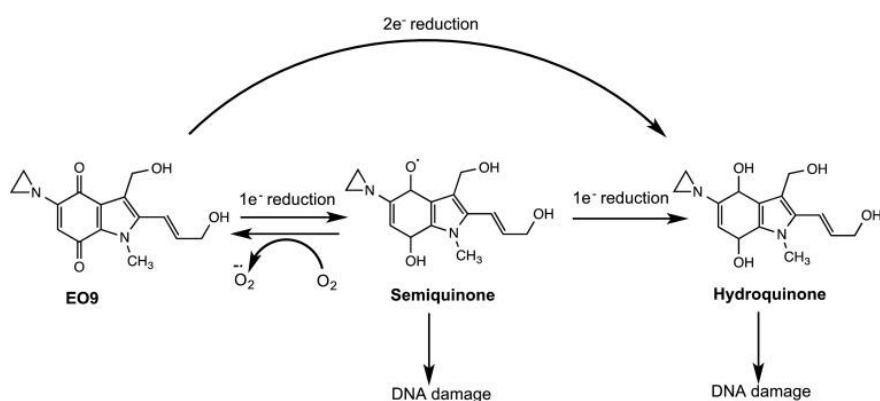


Figura 4: Mecanismo de ativação de EO9. Retirado de (12), um artigo *open access* (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Nos primeiros ensaios clínicos conduzidos, o fármaco era administrado por via intravenosa. A proteinúria reversível foi a toxicidade dose limitante evidenciada, não estando o fármaco associado a mielossupressão. Apesar dos resultados positivos em modelos pré-clínicos, *apaziquone* não demonstrou atividade anti-tumoral em ensaios de fase 2 em doentes com cancro da mama, do estômago, do pâncreas, colorretal e de pulmão de não pequenas células. Esta falta de atividade pode ser explicada pelas suas propriedades farmacocinéticas, nomeadamente pela sua rápida eliminação do organismo quando administrado por via intravenosa e pela fraca penetração em tecidos avasculares. Com base nestes dados foi explorada a opção de utilizar o fármaco em tratamentos loco-regionais, como por exemplo no tratamento de carcinoma de bexiga superficial em que a ressecção trans-uretral de tumores seguida de administração intravesical de QT ou imunoterapia de modo a reduzir o risco de recorrência constitui uma abordagem terapêutica já estabelecida. Nestes casos, a administração local de *apaziquone* após a ressecção trans-uretral permitiria um melhor contacto do fármaco com o tumor residual e a rápida eliminação do organismo limitaria a toxicidade sistémica caso o fármaco chegasse à circulação sistémica; para além disso, verificou-se que o carcinoma da bexiga expressa NQO1 em grande quantidade. Foram realizados vários ensaios tanto de fase 1 como de fase 2, que evidenciaram uma boa atividade clínica de *apaziquone* contra o carcinoma de bexiga superficial; foi verificado que o esquema é bem tolerado, sendo os efeitos adversos locais mais frequentes a hematúria e a disúria. Não foram observados efeitos adversos sistémicos. (45,46)

Foram posteriormente conduzidos 2 ensaios clínicos de fase 3 aleatorizados quase idênticos num total de 1614 doentes com carcinoma de bexiga superficial que avaliaram a eficácia de administração única de *apaziquone* após ressecção trans-uretral em comparação com o placebo. Não foi atingido o *cut-off* de melhoria de 12% na taxa de recorrência aos 2 anos (38% no grupo experimental e 44,6% no grupo controlo num dos estudos; 39,7% no grupo experimental e 46,3% no grupo controlo no outro). Quando administrado nos primeiros 30 minutos após a ressecção trans-uretral, *apaziquone* não demonstrou benefício em comparação com placebo; no entanto, nos grupos em que o fármaco foi administrado após 30 minutos foi verificada uma diferença substancial na taxa de recorrência aos 2 anos. (46,47)

A hematúria é frequente nos primeiros 30 minutos após a realização da ressecção trans-uretral e verificou-se que *apaziquone* é metabolizado pelo sangue humano, pelo que a hematúria pode ter sido o fator responsável pela reduzida eficácia do fármaco verificada nos ensaios de fase 3. Sugere-se que o fármaco não seja administrado imediatamente após o procedimento, devendo ser administrado cerca de  $60 \pm 30$  minutos após o mesmo, quando a hematúria é reduzida ou mesmo ausente. Atualmente encontra-se em fase ativa

outro ensaio clínico de fase 3 aleatorizado (NCT03224182) que pretende avaliar a eficácia de *apaziquone* quando administrado  $60 \pm 30$  minutos após resseção trans-uretral em comparação com placebo em 500 doentes. A sua conclusão está prevista para dezembro de 2022. (48)

*Apaziquone* é um bom exemplo de como os fármacos com propriedades farmacocinéticas limitadas podem ser aplicados em tratamentos loco-regionais. (45)

#### 4.2.4 PR-104

PR-104 é um composto nitro-aromático convertido pelas fosfatases em PR-104A, que posteriormente é reduzido com adição de  $1e^-$  ou  $2e^-$ . A redução com  $1e^-$  gera um intermediário nitro radical que, na ausência de  $O_2$ , passa por reações subsequentes formando os metabolitos ativos para-hidroxilamina PR-104H e para-amina PR-104M. A redução de  $2e^-$  pela AKR1C3 contorna a formação do intermediário sensível a  $O_2$  e gera o fármaco ativo independentemente do nível de  $O_2$  celular. Neste caso, a seletividade depende da expressão de níveis elevados de AKR1C3 no tumor. (12)

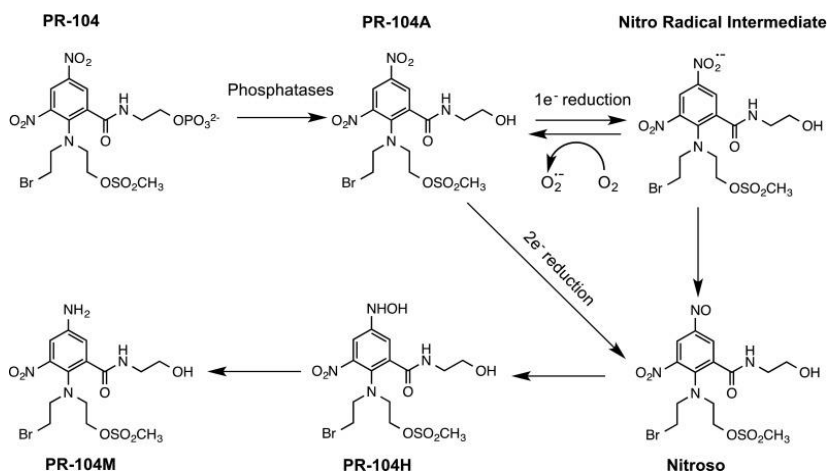


Figura 5: Mecanismo de ativação de PR-104. Retirado de (12), um artigo *open access* (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PR-104 foi desenvolvido com o objetivo de melhorar algumas características limitantes de fármacos anteriores; em comparação com TPZ, PR-104 é ativado preferencialmente em regiões de hipóxia mais grave e apresenta capacidade de se difundir para células adjacentes com  $pO_2$  mais elevada. (44)

Nos ensaios clínicos PR-104 era administrado por via intravenosa. O principal efeito adverso identificado foi a mielossupressão, nomeadamente neutropenia, trombocitopenia e anemia. São ainda descritos casos de fadiga, náuseas e vômitos. (49,50) Em associação com sorafenib em doentes com carcinoma hepatocelular a mielossupressão, especificamente a neutropenia febril e trombocitopenia, foi grave o suficiente para levar à descontinuação do estudo (51); a mielossupressão severa também foi verificada em associação com gemcitabina e docetaxel, mas a adição de fator estimulador de colónias de granulócitos a PR-104 e docetaxel permitiu reduzir este efeito adverso. (52)

Foi demonstrada alguma atividade anti-tumoral num estudo realizado em 50 doentes com leucemia mieloide aguda e leucemia linfoblástica aguda num estudo de fase 1 e 2 não aleatorizado. (53) No entanto, o único estudo de fase 2 aleatorizado reportado, realizado em 42 doentes com cancro de pulmão de não pequenas células que comparou a associação de PR-104 com docetaxel, foi terminado precocemente por se ter verificado uma baixa probabilidade de sucesso clínico (NCT00862134). Até ao momento o fármaco não foi avaliado em ensaios de fase 3.

Vários estudos empregaram FMISO-PET para deteção de áreas hipóxicas. Num deles, a hipóxia foi identificada na maioria dos doentes avaliados antes do tratamento; no entanto, não foi verificada relação entre a presença ou não de hipóxia e a resposta a PR-104, talvez pelo tamanho reduzido da amostra e população heterogénea de doentes avaliados. (52)

Um estudo avaliou os níveis de hipóxia recorrendo a pimonidazol e à avaliação imunohistoquímica de HIF-1 $\alpha$  e CA9, verificando-se uma redução da expressão de biomarcadores após o tratamento. No entanto, não foi verificada a associação entre a expressão de biomarcadores e a eficácia de PR-104. (53)

#### 4.2.5 AQ4N

AQ4N, também conhecido por *Banoxantrone*, faz parte dos N-óxidos alifáticos. Sofre uma redução de 2e<sup>-</sup> formando um intermediário mono-N-óxido (AQ4M); posteriormente sofre uma outra redução de 2e<sup>-</sup> formando AQ4, um potente inibidor da topoisomerase II. O O<sub>2</sub> inibe o processo de ativação ao competir com AQ4N pela ligação às enzimas redutoras. (12) O seu mecanismo de ativação é diferente dos outros HAPs, existindo redução de 2e<sup>-</sup> mas sendo esta sensível aos níveis de O<sub>2</sub>. (3)

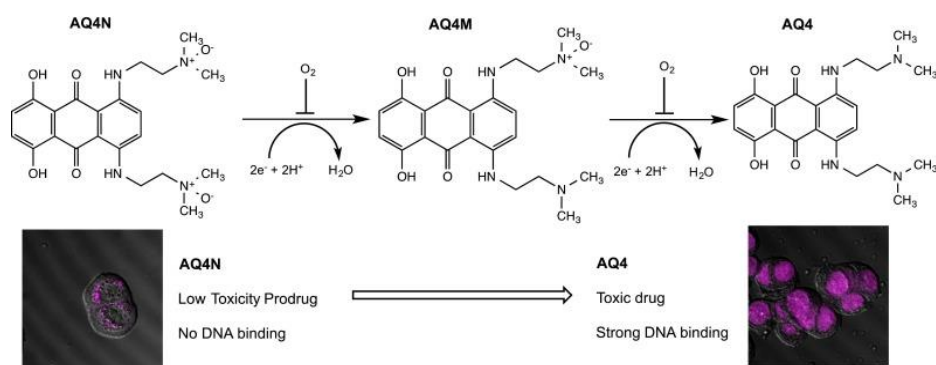


Figura 6: Mecanismo de ativação de AQ4N. Imagens inferiores mostram ausência de ligação ao DNA nas células tratadas com AQ4N e uma ligação forte ao DNA nas células tratadas com AQ4. Retirado de (12), artigo *open access* <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Nos ensaios clínicos o fármaco era administrado por via intravenosa. Geralmente foi bem tolerado e apresentou efeitos adversos ligeiros e moderados, nomeadamente coloração azul da pele e da urina com resolução em alguns dias, linfopenia, leucopenia, anemia, fadiga, náuseas, vômitos e diarreia. (54,55)

Num ensaio de fase 1 em 22 doentes com carcinoma do esófago um doente apresentou uma resposta parcial ao tratamento (54); noutra estudo de fase 1 em 16 doentes não foram verificadas respostas ao tratamento. (55) É importante referir que são estudos não aleatorizados com amostras reduzidas, pelo que os seus resultados são bastante limitados.

Foram também avaliadas amostras de tecidos normais e de tecidos tumorais no que toca à expressão de AQ4N, AQ4 e GLUT1. Verificou-se que, ao contrário dos tecidos normais, os tumores apresentam um aumento da expressão de GLUT1 e que as secções com maior expressão de GLUT1 apresentavam simultaneamente uma maior expressão do metabolito ativo AQ4 – são resultados consistentes com a ativação de AQ4N em AQ4 preferencialmente em regiões hipóxicas do tumor e com a acumulação de AQ4 no tumor e não nos tecidos normais. (56)

Encontram-se listados 3 estudos adicionais relativos a AQ4N, mas o estado em que se encontram é atualmente desconhecido (NCT00109356, NCT00394628, NCT00090727). O desenvolvimento deste fármaco não progrediu para além dos ensaios de fase 2 (3); no entanto, existem novos análogos em desenvolvimento. (12)

#### 4.2.6 Evofosfamide

*Evofosfamide*, também conhecido por TH-302, é um composto 2-nitroimidazol de bromo-isofosforamide cuja síntese e avaliação pré-clínica foi iniciada em 2008. É reduzido pelas oxidoredutases de  $1e^-$  formando um radical intermediário que, em condições hipóxicas, sofre fragmentação e liberta o composto mostarda de bromo-isofosforamide (Br-IPM), um potente agente alquilante de DNA. (12) É considerado um HAP de segunda geração pois foi criado de modo a apresentar características melhores do que HAPs anteriormente avaliados, nomeadamente: ausência de ativação pelas redutases de  $2e^-$  insensíveis ao  $O_2$ ; ativação preferencial em regiões de hipóxia grave com  $O_2 < 0,5\%$  e potencial de difusão para tecidos adjacentes após a ativação. (57)

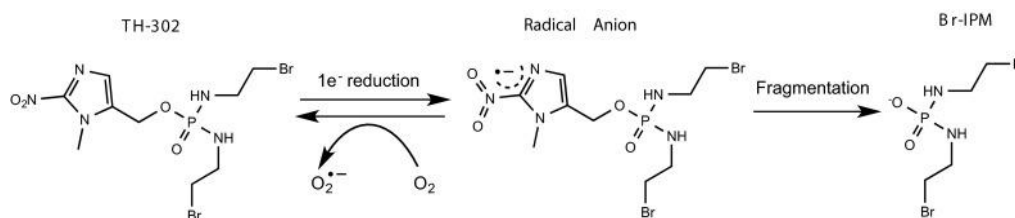


Figura 7: Mecanismo de ativação de *evofosfamide*. Retirado de (12), um artigo *open access* (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

*Evofosfamide* foi alvo de avaliação em humanos em múltiplos ensaios clínicos. O fármaco foi administrado por infusão intravenosa em monoterapia ou em combinação com outros agentes, em doses e esquemas terapêuticos variados. A dose máxima tolerada foi estabelecida em função da toxicidade cutânea e das mucosas evidenciada, responsável por dor e desconforto intensos em áreas de descamação e de ulceração; estes efeitos foram reversíveis após interrupção do fármaco ou redução da dose administrada ou intervenção local nas zonas afetadas. (57) Relativamente aos efeitos nas mucosas, a estomatite foi o efeito adverso mais frequente; foram ainda descritos casos de úlceras anorretais, vaginite, proctite e esofagite. (57–59) No que toca à toxicidade cutânea, esta foi mais evidente em pregas cutâneas, com a presença frequente de eritema e descamação da pele. Em alguns casos foi descrita hiperpigmentação cutânea. (57)

Efeitos adversos hematológicos decorrentes da mielossupressão, nomeadamente anemia, leucopenia, neutropenia e trombocitopenia, foram encontrados em muitos doentes; no entanto, eram geralmente moderados e limitados, não sendo dose limitantes. (57,58,60) Náuseas, vômitos, fadiga, diarreia, obstipação e edema periférico também foram descritos com frequência. (57–59) *Evofosfamide* não demonstrou apresentar toxicidade renal, hepática ou cardíaca. (61,62)

Vários ensaios clínicos de fase 2 evidenciaram uma resposta positiva associada a *evofosfamida*: em combinação com bevacizumab em doentes com glioblastoma o intervalo livre de doença e a sobrevivência geral foram mais elevados (63); o fármaco demonstrou uma eficácia moderada em combinação com bortezomib e dexametasona em doentes com mieloma múltiplo (64); em combinação com doxorrubicina em doentes com sarcoma de tecidos moles foi verificada uma melhoria do intervalo livre de doença, da sobrevivência geral e da taxa de resposta do tumor ao tratamento (61); num ensaio de fase 2 aleatorizado em associação com gemcitabina em 214 doentes com adenocarcinoma pancreático demonstrou intervalo livre de doença, sobrevivência geral e taxa de resposta superiores em comparação com o grupo controlo. (62)

Um ensaio de fase 2 de doentes com cancro do trato biliar associou *evofosfamida* com avaliação das regiões hipóxicas por FMISO-PET e da atividade metabólica do tumor por FDG-PET, realizados antes do tratamento e após 8 semanas do mesmo. Verificou-se uma redução da atividade metabólica do tumor em 53,3% dos doentes após o tratamento e níveis elevados de hipóxia medidos por FMISO-PET foram associadas a pior prognóstico. Verificou-se ainda que FMISO-PET permite ter uma melhor ideia da progressão da doença do que os parâmetros metabólicos. (65)

Apesar destas respostas positivas, 2 ensaios clínicos de fase 3 não comprovaram o benefício do fármaco. Um estudo comparou a eficácia de doxorrubicina isolada e em combinação com *evofosfamida* em 640 doentes com sarcoma de tecidos moles. Apesar de existir uma taxa de resposta do tumor mais alta com *evofosfamida*, não foram verificadas diferenças significativas na sobrevivência geral (18,4 meses no grupo experimental e 19 meses no grupo controlo) ou no intervalo livre de doença (6,3 meses no grupo experimental e 6 meses no grupo controlo), não sendo recomendada esta associação. (60) Um outro ensaio clínico de 693 doentes com adenocarcinoma pancreático comparou a utilização de gemcitabina com *evofosfamida* ou com placebo. Apesar de existir uma diferença ligeira na sobrevivência geral entre os 2 grupos (8,7 meses no grupo experimental e 7,6 meses no grupo controlo), esta não foi estatisticamente significativa. (66)

Um ensaio clínico de fase 2 aleatorizado de pemetrexed associado com *evofosfamida* ou com placebo em 265 doentes com cancro de pulmão de não pequenas células foi terminado precocemente por não se ter verificado uma eficácia suficiente desta associação, com sobrevivência geral aos 2 anos de 38,1% no grupo experimental e de 37,4% no grupo controlo (NCT02093962). Posteriormente à descontinuação do desenvolvimento clínico de *evofosfamida* outros estudos foram terminados (NCT02255110, NCT02047500).

#### 4.2.7 Pró-fármacos ativados pela hipóxia em associação com embolização trans-arterial

A embolização trans-arterial (TAE) é uma técnica utilizada para o tratamento de carcinoma hepatocelular avançado quando a taxa de ressecção cirúrgica é baixa. Tendo em conta a exacerbação da hipóxia causada pela embolização dos vasos que nutrem o tumor, faz sentido associar um HAP ao regime terapêutico. (67)

Atualmente encontram-se listados vários estudos que associam HAPs a TAE, nomeadamente 4 ensaios que pretendem avaliar a eficácia da TAE em associação com TPZ. 2 ensaios encontram-se em fase ativa: um ensaio de fase 1 e 2 não aleatorizado pretende determinar a dose ótima e tolerabilidade de TPZ administrado por injeção intra-arterial antes de TAE em 63 doentes com carcinoma hepatocelular, estando prevista a sua conclusão em 2021 (NCT02174549); existe ainda um ensaio de fase 2 aleatorizado que pretende comparar a TAE utilizando doxorrubicina ou TPZ em 134 doentes com carcinoma hepatocelular, estando também previsto acabar em 2021 (NCT03145558).

Os outros 2 ensaios pretendem avaliar a TAE associando TPZ a anticorpos monoclonais. Um ensaio de fase 2 não aleatorizado, atualmente a recrutar os participantes, pretende associar TAE com TPZ e nivolumab ou pembrolizumab em 80 doentes com carcinoma hepatocelular, colorretal, gástrico e de pulmão de não pequenas células que apresentem metástases hepáticas; a sua conclusão está prevista para 2022 (NCT03259867). O ensaio mais recente de fase 2 não aleatorizado pretende também associar TAE com TPZ e pembrolizumab em doentes com cancro colorretal ou de pulmão de não pequenas células com metástases hepáticas; ainda não está em fase de recrutamento de doentes e a sua conclusão está prevista para 2023 (NCT04701476).

Existe ainda um ensaio clínico de fase 1 cujo objetivo consiste em determinar a dose máxima tolerada de *evofosfamida* quando administrado com doxorrubicina via TAE em doentes com carcinoma hepatocelular, mas atualmente é desconhecido o estado em que se encontra (NCT01721941).

Um estudo descreve a criação de microesferas carregadas com *evofosfamida* que permitem uma distribuição localizada e sustentada do fármaco na proximidade do tumor quando administradas via TAE – pretende-se que as microesferas limitem o suprimento sanguíneo ao tumor e que *evofosfamida* atue nas células hipóxicas, obtendo-se um efeito sinérgico. Após avaliação em modelos celulares e animais verificou-se uma libertação prolongada e uma maior atividade anti-tumoral das microesferas quando comparadas com injeção simples de *evofosfamida* ou com administração do fármaco associado a agentes embolizantes usados atualmente, existindo respostas parciais em modelos animais. Assim, as microesferas carregadas com *evofosfamida* poderão constituir uma

técnica promissora no tratamento com recurso a TAE dos doentes com carcinoma hepatocelular. (67)

#### 4.2.8 Pró-fármacos ativados pela hipóxia com alvos moleculares

Os HAPs clássicos descritos anteriormente atuam por meio de libertação de agentes citotóxicos causadores de lesões no DNA, existindo sobreposição do seu mecanismo de ação com o dos agentes da QT e RT, o que poderá explicar os efeitos adversos e as baixas doses toleradas em ensaios clínicos. Posto isto, procedeu-se ao desenvolvimento de um novo tipo de fármacos que libertam um composto com atuação molecular específica, em vez de atuar no DNA. (3)

O HAP mais avançado deste grupo é o Tarloxotinib ou TH-4000, um inibidor bio-reduzível dos recetores do fator de crescimento epidermoide humano (HER). A sinalização via HER está envolvida na regulação do crescimento e sobrevivência celulares e encontra-se muitas vezes excessivamente ativada em vários cancros. Tarloxotinib passa por uma reação de redução com adição de  $1e^-$ , libertando o inibidor da tirosina cinase do HER. Apesar de teoricamente promissor, 2 ensaios de fase 2 foram terminados precocemente por falta de eficácia (NCT02454842, NCT02449681). (3) Encontra-se listado um outro ensaio de fase 2, atualmente em fase de recrutamento de participantes, que pretende avaliar o fármaco em doentes com cancro de pulmão de não pequenas células (NCT03805841).

No momento da ativação, os HAPs também podem libertar compostos que inibem a reparação de lesões no DNA, sensibilizando as células hipóxicas para as lesões induzidas por QT e/ou RT. Exemplos incluem inibidores de poli(ADP-ribose) polimerase e inibidores de  $O^6$  alquilguanina-DNA alquiltransferase, enzimas responsáveis pela reparação do DNA. (3)

**Folha em branco**

## 5. Discussão

A hipóxia tumoral, o seu impacto na progressão do cancro e as suas potenciais aplicações terapêuticas constituem uma área de investigação altamente complexa que se encontra em constante evolução.

A grande maioria da literatura existente aponta para o papel da hipóxia tumoral e de HIF na regulação de processos celulares como a passagem da fosforilação oxidativa para a realização da glicólise anaeróbia, indução do processo de metastização e resistência à RT e QT, sendo evidenciada a sua importância para a progressão do cancro. (8,9)

Desde os primeiros ensaios clínicos até à atualidade verificam-se tentativas de aperfeiçoar as propriedades farmacológicas dos HAPs de modo a obter resultados positivos, nomeadamente a criação de análogos de TPZ e de AQ4N com melhores propriedades de difusão (12); criação de PR-104 de modo ser ativado em regiões de hipóxia grave e de possuir a capacidade de difusão para células adjacentes (44); da mesma forma, *evofosfamida* evidencia uma melhoria em comparação com HAPs previamente avaliados, pois é ativado exclusivamente por redutases de  $1e^-$  em zonas de hipóxia grave e apresenta potencial para difusão para as células adjacentes. (57) O caso de *apaziquone* é diferente, pois em vez de serem modificadas as propriedades farmacológicas limitantes demonstradas pelo fármaco quando administrado por via intravenosa, estas foram aplicadas para a sua utilização em tratamentos loco-regionais. (45) HAPs com alvos moleculares também constituem uma melhoria em relação aos HAPs clássicos, por apresentarem alvos de atuação mais específicos. (3)

Apesar dos esforços efetuados, o benefício de HAPs não foi demonstrado nos ensaios clínicos de fase 3 e, até ao momento, nenhum HAP foi aprovado para uso clínico (12,34), existindo múltiplos fatores que contribuem para estes resultados negativos.

Vários fármacos são ativados tanto por redutases de  $1e^-$  como de  $2e^-$ , podendo ocorrer a sua ativação fora do ambiente hipóxico. (12) As redutases podem estar presentes em tecidos normais, como é o caso de AKR1C3 – a ativação de PR-104 em tecidos normais poderá ter sido responsável pelos efeitos adversos e ter constituído um fator limitante para o seu uso. (34)

Apesar de haver alguns estudos que procederam à avaliação dos níveis de hipóxia tumoral antes e ao longo do tratamento, nos ensaios de fase 3 não existiu nenhum tipo de estratificação dos doentes de acordo com os níveis de hipóxia. A estratificação fornece a possibilidade de identificar os doentes com os tumores mais hipóxicos que, na teoria, beneficiariam mais do tratamento com HAPs. (34)

É necessário aguardar pela conclusão dos ensaios clínicos atualmente em fase ativa, nomeadamente dos ensaios de TAE em associação com HAPs, do ensaio de fase 3 aleatorizado de *apaziquone* administrado 60±30 minutos após resseção trans-uretral (NCT03224182) e de tarloxotinib (NCT03805841). De acordo com os resultados obtidos, serão feitas as conclusões sobre a aplicabilidade de HAPs nos contextos em que foram avaliados.

## 6. Conclusão e perspetivas futuras

Com o aumento da incidência e da mortalidade por doenças oncológicas é cada vez mais necessário desenvolver novas abordagens terapêuticas. (3)

A hipóxia tumoral encontra-se presente na maioria dos tumores sólidos, decorrente da existência de uma rede vascular atípica. Causa resistência aos tratamentos oncológicos convencionais e está associada a um pior prognóstico; por estas razões, constitui uma oportunidade terapêutica importante a ser explorada. (12)

HAPs são fármacos ativados em células hipóxicas por ação de enzimas oxidoreduções. Apesar de décadas de investigação, poucos fármacos avançaram para ensaios clínicos e nos ensaios de fase 3 não foram demonstrados resultados positivos consistentes, pelo que ainda nenhum HAP foi aprovado para uso clínico. (12,34)

A distribuição de HAPs para as regiões hipóxicas dos tumores encontra-se muitas vezes limitada pela presença de uma rede vascular anormal, pelo que é necessário otimizar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, de modo a permitir uma melhor difusão para o seu local preferencial de ação. (3,68) Uma forma de melhorar a capacidade de difusão passa pela incorporação de HAPs em nanopartículas. Os novos HAPs que vão sendo sintetizados devem ser testados em modelos *in silico*, ou seja, em modelos computacionais que permitem simular a sua ação e eficácia de forma não invasiva, com possibilidade de otimizar o tratamento. Tendo em conta que existe uma grande dependência dos vasos sanguíneos para uma distribuição eficaz, estes modelos devem incluir dados detalhados relativamente à rede vascular, angiogénese e perfusão dos tumores. Os modelos *in silico* permitem, assim, selecionar os fármacos com maior potencial, e estes deverão posteriormente ser avaliados em ensaios clínicos. (68)

Destaca-se a necessidade de identificação de enzimas oxidoreduções responsáveis pela ativação de HAPs e da sua distribuição pelos tecidos. Verifica-se ainda a necessidade de estratificação dos doentes de acordo com os seus níveis de hipóxia em futuros ensaios clínicos. Esta estratificação poderá ser feita em ensaios de fase 2 recorrendo a biomarcadores de hipóxia; posteriormente, apenas os doentes com tumores que apresentem níveis de hipóxia grave e, conseqüentemente, uma elevada probabilidade de beneficiarem do tratamento com HAPs, irão participar nos ensaios clínicos de fase 3, nos quais serão distribuídos de forma aleatória para o grupo controlo ou para o grupo experimental. Desta forma evita-se o tratamento potencialmente fútil de doentes com tumores pouco hipóxicos. (34).

Apesar da ausência de resultados clínicos positivos, o conhecimento existente sobre a hipóxia tumoral e sobre os HAPs aumentou substancialmente ao longo do tempo e deve ser incorporado em futuros trabalhos de investigação. (12)

## Referências bibliográficas

1. International Agency for Research on Cancer WHO. PRESS RELEASE N° 292 [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 3]. Available from: [https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2020/12/pr292\\_E.pdf](https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2020/12/pr292_E.pdf)
2. WHO. Cancer [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 3]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. Mistry IN, Thomas M, Calder EDD, Conway SJ, Hammond EM. Clinical Advances of Hypoxia-Activated Prodrugs in Combination With Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2017;98(5):1183–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.03.024>
4. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis. *IUBMB Life*. 2008;60(9):591–7.
5. Höckel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(4):266–76.
6. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:225–39.
7. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510–4.
8. Liao C, Zhang Q. Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases. *Am J Pathol* [Internet]. 2020;190(8):1584–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.04.003>
9. Yang G, Shi R, Zhang Q. Hypoxia and oxygen-sensing signaling in gene regulation and cancer progression. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1–24.
10. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Res*. 1999;59(22):5830–5.
11. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The Expression and Distribution of the Hypoxia-Inducible Factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in Normal Human Tissues, Cancers, and Tumor-Associated Macrophages. *Am J*

- Pathol. 2000;157(2):411–21.
12. Phillips RM. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77(3):441–57.
  13. McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours — implications for treatment response. *Br J Radiol*. 2014;87:1–12.
  14. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):281–90.
  15. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249–57.
  16. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res*. 2010 May 1;86(2):236–42.
  17. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;59(1):15–26.
  18. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia [Internet]*. 2015;3:83–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/HP.S93413>
  19. Saxena K, Jolly MK. Acute vs. Chronic vs. Cyclic hypoxia: Their differential dynamics, molecular mechanisms, and effects on tumor progression. *Biomolecules*. 2019;9:1–27.
  20. Jaakkola P, Mole DR, Tian Y-M, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science (80- )*. 2001;292(5516):468–72.
  21. Nguyen TL, Durán R V. Prolyl hydroxylase domain enzymes and their role in cell signaling and cancer metabolism. *Int J Biochem Cell Biol [Internet]*. 2016;80:71–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.026>
  22. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3664–71.
  23. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci [Internet]*. 2012;33(4):207–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.01.005>

24. Lin S-C, Liao W-L, Lee J-C, Tsai S-J. Hypoxia-regulated gene network in drug resistance and cancer progression. *Exp Biol Med*. 2014;239(7):779–92.
25. Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DMS. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* [Internet]. 2010;112(1):3–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2008.11.022>
26. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):319–31.
27. Hapke RY, Haake SM. Hypoxia-induced epithelial to mesenchymal transition in cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2020;487(February):10–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.012>
28. Xia Y, Jiang L, Zhong T. The role of HIF-1 $\alpha$  in chemo-/radioresistant tumors. *Oncotargets Ther* [Internet]. 2018;11:3003–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S158206>
29. Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J Radiat Res*. 2016;57(S1):i99–105.
30. Cosse J-P, Michiels C. Tumour Hypoxia Affects the Responsiveness of Cancer Cells to Chemotherapy and Promotes Cancer Progression. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008;8(7):790–7.
31. Harada H. How Can We Overcome Tumor Hypoxia in Radiation Therapy? *J Radiat Res*. 2011;52(5):545–56.
32. Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2011;14(3):191–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2011.03.001>
33. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(6):393–410. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3064>
34. Spiegelberg L, Houben R, Niemans R, de Ruyscher D, Yaromina A, Theys J, et al. Hypoxia-activated prodrugs and (lack of) clinical progress: The need for hypoxia-based biomarker patient selection in phase III clinical trials. *Clin Transl Radiat Oncol* [Internet]. 2019;15:62–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.01.005>

35. Denny WA. The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. *Lancet Oncol*. 2000;1:25–9.
36. von Pawel J, von Roemeling R, Gatzemeier U, Boyer M, Elisson LO, Clark P, et al. Tirapazamine plus cisplatin versus cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A report of the international CATAPULT I study group. *J Clin Oncol*. 2000;18(6):1351–9.
37. DiSilvestro PA, Ali S, Craighead PS, Lucci JA, Lee Y-C, Cohn DE, et al. Phase III Randomized Trial of Weekly Cisplatin and Irradiation Versus Cisplatin and Tirapazamine and Irradiation in Stages IB2, IIA, IIB, IIIB, and IVA Cervical Carcinoma Limited to the Pelvis: A Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Feb 10;32(5):458–64. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.51.4265>
38. Williamson SK, Crowley JJ, Lara Jr PN, McCoy J, Lau DHM, Tucker RW, et al. Phase III trial of paclitaxel plus carboplatin with or without tirapazamine in advanced non-small-cell lung cancer: Southwest Oncology Group Trial S0003. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Dec 20;23(36):9097–104. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.01.3771>
39. Rischin D, Peters LJ, O’Sullivan B, Giralt J, Fisher R, Yuen K, et al. Tirapazamine, Cisplatin, and Radiation Versus Cisplatin and Radiation for Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (TROG 02.02, HeadSTART): A Phase III Trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jun 20;28(18):2989–95. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.27.4449>
40. Lim AM, Rischin D, Fisher R, Cao H, Kwok K, Truong D, et al. Prognostic Significance of Plasma Osteopontin in Patients with Locoregionally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Treated on TROG 02.02 Phase III Trial. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 Jan 1;18(1):301–7. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-2295>
41. Mack PC, Redman MW, Chansky K, Williamson SK, Farneth NC, Lara Jr PN, et al. Lower osteopontin plasma levels are associated with superior outcomes in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy: SWOG study S0003. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Oct 10;26(29):4771–6. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.17.0662>

42. Rischin D, Peters L, Hicks R, Hughes P, Fisher R, Hart R, et al. Phase I Trial of Concurrent Tirapazamine, Cisplatin, and Radiotherapy in Patients With Advanced Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(2):535–42.
43. Rischin D, Hicks RJ, Fisher R, Binns D, Corry J, Porceddu S, et al. Prognostic Significance of [18F]-Misonidazole Positron Emission Tomography–Detected Tumor Hypoxia in Patients With Advanced Head and Neck Cancer Randomly Assigned to Chemoradiation With or Without Tirapazamine: A Substudy of Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02. *J Clin Oncol* [Internet]. 2006 May 1;24(13):2098–104. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.05.2878>
44. Hicks KO, Myint H, Patterson A V., Pruijn FB, Siim BG, Patel K, et al. Oxygen Dependence and Extravascular Transport of Hypoxia-Activated Prodrugs: Comparison of the Dinitrobenzamide Mustard PR-104A and Tirapazamine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;69(2):560–71.
45. Phillips RM, Hendriks HR, Peters GJ. EO9 (Apaziquone): from the clinic to the laboratory and back again. *Br J Pharmacol*. 2013;168:11–8.
46. Phillips RM, Hendriks HR, Sweeney JB, Reddy G, Peters GJ. Efficacy, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of apaziquone in the treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2017;13(7):783–91. Available from: <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1341490>
47. Karsh L, Shore N, Soloway M, Bhat G, Reddy G, Leu SY, et al. Double-Blind, Randomized, Placebo-controlled Studies Evaluating Apaziquone (EO9, Qapzola™) Intravesical Instillation Post Transurethral Resection of Bladder Tumors for the Treatment of Low-risk Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Bl Cancer*. 2018;4(3):293–301.
48. Phillips RM, Loadman PM, Reddy G. Inactivation of apaziquone by haematuria: implications for the design of phase III clinical trials against non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2019;83(6):1183–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-019-03812-7>
49. Jameson MB, Rischin D, Pegram M, Gutheil J, Patterson A V., Denny WA, et al. A phase I trial of PR-104, a nitrogen mustard prodrug activated by both hypoxia and aldo-keto reductase 1C3, in patients with solid tumors. *Cancer Chemother*

- Pharmacol. 2010;65(4):791–801.
50. McKeage MJ, Gu Y, Wilson WR, Hill A, Amies K, Melink TJ, et al. A phase I trial of PR-104, a pre-prodrug of the bioreductive prodrug PR-104A, given weekly to solid tumour patients. *BMC Cancer* [Internet]. 2011;11(432):1–12. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/432>
  51. Abou-Alfa GK, Chan SL, Lin C-C, Chiorean EG, Holcombe RF, Mulcahy MF, et al. PR-104 plus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68(2):539–45.
  52. McKeage MJ, Jameson MB, Ramanathan RK, Rajendran J, Gu Y, Wilson WR, et al. PR-104 a bioreductive pre-prodrug combined with gemcitabine or docetaxel in a phase Ib study of patients with advanced solid tumours. *BMC Cancer* [Internet]. 2012;12(496):2–10. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/496>
  53. Konopleva M, Thall PF, Yi CA, Borthakur G, Coveler A, Bueso-Ramos C, et al. Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(7):927–34.
  54. Steward WP, Middleton M, Benghiat A, Loadman PM, Hayward C, Waller S, et al. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points to determine the dose of AQ4N , a novel hypoxic cell cytotoxin , given with fractionated radiotherapy in a phase I study. *Ann Oncol* [Internet]. 2007;18(6):1098–103. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm120>
  55. Papadopoulos KP, Goel S, Beeram M, Wong A, Desai K, Haigentz M, et al. A Phase 1 Open-Label, Accelerated Dose-Escalation Study of the Hypoxia-Activated Prodrug AQ4N in Patients with Advanced Malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):7110–6.
  56. Albertella MR, Loadman PM, Jones PH, Phillips RM, Rampling R, Burnet N, et al. Hypoxia-Selective Targeting by the Bioreductive Prodrug AQ4N in Patients with Solid Tumors: Results of a Phase I Study. *Clin Cancer Res*. 2008;14(4):1096–105.
  57. Weiss GJ, Infante JR, Chiorean EG, Borad MJ, Bendell JC, Molina JR, et al. Phase 1 study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of TH-302, a hypoxia-activated prodrug, in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2011;17(9):2997–3004.

58. Riedel RF, Meadows KL, Lee PH, Morse MA, Uronis HE, Blobe GC, et al. Phase I study of pazopanib plus TH-302 in advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79(3):611–9.
59. Badar T, Handisides DR, Benito JM, Richie MA, Borthakur G, Jabbour E, et al. A Phase I Study of Evofosfamide, an Investigational Hypoxia- Activated Prodrug, in Patients with Advanced Leukemia. *Am J Hematol.* 2016;91(8):800–5.
60. Tap WD, Papai Z, Van Tine BA, Attia S, Ganjoo KN, Jones RL, et al. Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARCO21): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(8):1089–103.
61. Chawla SP, Cranmer LD, Van Tine BA, Reed DR, Okuno SH, Butrynski JE, et al. Phase II study of the safety and antitumor activity of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol.* 2014;32(29):3299–306.
62. Borad MJ, Reddy SG, Bahary N, Uronis HE, Sigal D, Cohn AL, et al. Randomized phase II trial of gemcitabine plus TH-302 versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(13):1475–81.
63. Brenner AJ, Floyd J, Fichtel L, Michalek J, Kanakia KP, Huang S, et al. Phase 2 trial of hypoxia activated evofosfamide (TH302) for treatment of recurrent bevacizumab - refractory glioblastoma. *Sci Rep [Internet].* 2021;11(2306):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81841-0>
64. Laubach JP, Liu C-J, Raje NS, Yee AJ, Armand P, Schlossman RL, et al. A Phase 1/2 Study of evofosfamide, A Hypoxia-Activated Prodrug with or without Bortezomib in Subjects with Relapsed/ Refractory Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2019;25(2):478–86.
65. Yoon J, Kang SY, Lee K-H, Cheon GJ, Oh D-Y. Targeting Hypoxia Using Evofosfamide and Companion Hypoxia Imaging of FMISO-PET in Advanced Biliary Tract Cancer. *Cancer Res Treat [Internet].* 2021;53(2):471–9. Available from: <https://doi.org/10.4143/crt.2020.577>
66. Van Cutsem E, Lenz H-J, Furuse J, Tabernero J, Heinemann V, Ioka T, et al. MAESTRO: A randomized, double-blind phase III study of evofosfamide (Evo) in combination with gemcitabine (Gem) in previously untreated patients (pts) with

- metastatic or locally advanced unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 May 20 [cited 2021 Apr 20];34(15\_suppl):4007–4007. Available from: [https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15\\_suppl.4007](https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.4007)
67. Ma P, Chen J, Qu H, Li Y, Li X, Tang X, et al. Hypoxic targeting and activating TH-302 loaded transcatheter arterial embolization microsphere. *Drug Deliv* [Internet]. 2020;27(1):1412–24. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1831102>
68. Forster JC, Marcu LG, Bezak E. Approaches to combat hypoxia in cancer therapy and the potential for in silico models in their evaluation. *Phys Medica* [Internet]. 2019;64(June):145–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2019.07.006>

# Anexos

## Anexo 1 – Autorização para reprodução da Figura 1

### License Details

This Agreement between FCS-UBI -- Elena Sochirca ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

[Print](#) [Copy](#)

License Number	5037200426830
License date	Mar 27, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	The American Journal of Pathology
Licensed Content Title	Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases
Licensed Content Author	Chengheng Liao, Qing Zhang
Licensed Content Date	Aug 1, 2020
Licensed Content Volume	190
Licensed Content Issue	8
Licensed Content Pages	12
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of translations	1
Title	Hipoxia tumoral: contribuição para a progressão do cancro e o papel terapêutico de pró-fármacos ativados por hipoxia
Institution name	FCS-UBI
Expected presentation date	Jul 2021
Portions	Figure 1
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	FCS-UBI Av. Infante D. Henrique  Covilhã, 6200-506 Portugal Attn: FCS-UBI GB 494 6272 12
Publisher Tax ID	
Total	0.00 EUR

[BACK](#)