

Tânia Luís João

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O Stresse Oxidativo como Estratégia Terapêutica Anticancerígena” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Ana Sofia Lopes Baptista e da Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Tânia Luís João

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O Stresse Oxidativo como Estratégia Terapêutica Anticancerígena”
referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Ana Sofia Lopes Baptista e da
Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2018

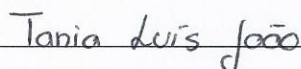


UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Tânia Luís João, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012140020, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O stresse oxidativo como estratégia terapêutica anticancerígena” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 16 de julho de 2018.



(Tânia Luís João)

Agradecimentos

Durante o meu percurso académico, foram várias pessoas que me apoiaram e estiveram presentes em todos os momentos. Assim sendo, agradeço:

Ao meu Pai, à minha Mãe e ao meu Irmão, por todo o apoio que me deram em todas as fases da minha vida, por toda a paciência que tiveram nos momentos mais stressantes, por acreditarem sempre em mim e, sobretudo, por me fazerem acreditar em mim mesma.

Ao Sérgio Santos que esteve presente nos melhores e nos piores momentos, que fez de mim uma pessoa mais calma, mais confiante e que acreditou sempre em mim. À Despina Argyropoulou que acreditou em mim e me apoiou constantemente.

Às minhas amigas Fátima Fernandes, Joana Rolo e Ana Pinheiro, que para além do apoio constante, estiveram sempre presentes em todas as lutas, fizeram parte deste percurso e sem as quais este teria sido mais difícil. O que a FFUC uniu, nada nem ninguém consegue separar!

À Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva não só pela orientação, mas também pelo seu apoio, disponibilidade e amabilidade.

À Doutora Ana Sofia Lopes Baptista não só pela orientação e pelos ensinamentos, mas sobretudo por me fazer sentir parte da família da farmácia, pelo apoio, pelos conselhos e por ter feito do meu estágio um dos melhores momentos do meu percurso académico.

À restante equipa da Farmácia Santa Isabel, à Dra. Ana Rodrigues, à Dra. Ana Vaz, ao Sr. Rui Borges e ao Sr. Rui Costa, um grande obrigada por toda a disponibilidade, apoio, conselhos, boa disposição diária e sobretudo amizade.

Índice

Parte I – Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. ANÁLISE SWOT.....	8
2.1. PONTOS FORTES.....	8
2.2. PONTOS FRACOS.....	12
2.3. OPORTUNIDADES.....	14
2.4. AMEAÇAS.....	16
3. CONCLUSÃO	18
ANEXO I.....	19
ANEXO II.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
Parte II – O stresse oxidativo como estratégia terapêutica anticancerígena.....	26
LISTA DE ABREVIATURAS	27
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO	32
3. DEFESAS ANTIOXIDANTES DAS CÉLULAS.....	34
4. CÉLULAS NEOPLÁSICAS	38
5. FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	39
6. RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO	41
7. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO COMO UMA TERAPIA ANTICANCERÍGENA.....	42
7.1. PORQUÊ UMA TERAPIA ANTICANCERÍGENA PRÓ-OXIDANTE?	43
7.2. VÁRIAS TERAPIAS PRÓ-OXIDANTES ANTICANCERÍGENAS.....	45
7.2.1. INDUÇÃO DA SÍNTESE DE ROS DIRETAMENTE NAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS .	46
7.2.2. INIBIÇÃO DOS SISTEMAS DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS (DEFESA).....	47
7.3. TERAPIA FOTODINÂMICA	48
7.4. TERAPIA COMBINADA DE AGENTE PRODUTOR DE ROS E FÁRMACOS OU TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS	49
8. BENEFÍCIO/RISCO DE TERAPIAS DE REGULAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO	49
8.1. SELETIVIDADE DAS TERAPIAS.....	50
8.2. EFICÁCIA: AUMENTAR OU DIMINUIR O NÍVEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO?	51

8.3. CÉLULAS NEOPLÁSICAS OXIDADAS E TECIDOS NORMAIS REDUZIDOS: INTERFERÊNCIA DISCRIMINATIVA COM AS ROS?.....	53
8.4. CUIDADOS NA DETEÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO	54
9. O PAPEL DO FARMACÊUTICO NO ACOMPANHAMENTO DE DOENTES ONCOLÓGICOS.....	55
10. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

PARTE I

Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária

Orientado pela:

Dra. Ana Sofia Lopes Baptista

LISTA DE ABREVIATURAS

ANF – Associação Nacional de Farmácias

FSA – *Fac Secundum Artem* (Faça segundo a sua arte)

INE – Instituto Nacional de Estatística

LEF – Laboratório de Estudos Farmacêuticos

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácias

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PUV – Produto de Uso Veterinário

PVP – Preço de Venda ao Público

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats* (Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças)

I. INTRODUÇÃO

O trabalho do farmacêutico na farmácia comunitária é a vertente mais visível da atividade farmacêutica para a comunidade em geral.

O farmacêutico encontra-se numa posição privilegiada de proximidade com o doente, sendo que o seu papel vai muito além da simples cedência de medicamentos. Muitas vezes, este representa o único contacto que o doente tem com um profissional de saúde, o que lhe confere uma importância cada vez maior. É uma profissão que intervém em diversas áreas da saúde pública, como a educação para a saúde, a informação e o aconselhamento farmacêutico, a dispensa de medicamentos, o acompanhamento do uso racional dos medicamentos, a prestação de serviços de autocuidados, entre outras. O farmacêutico tem de ter um conhecimento amplo quer a nível de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), quer de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), para conseguir analisar as situações, identificar as necessidades e tomar as decisões mais acertadas.

O serviço desempenhado por um farmacêutico comunitário exige uma grande responsabilidade, competência, dinamismo e profissionalismo. Apesar deste serviço ter uma extrema importância e impacto na sociedade, este é ainda desvalorizado, quer pela comunidade farmacêutica, quer pela população. Este estágio curricular é muito importante para que os futuros farmacêuticos tenham consciência da importância do seu papel na sociedade.

O estágio curricular é o elo de ligação entre a faculdade e o mercado de trabalho. Este permite-nos colocar em prática os conhecimentos teórico-práticos adquiridos ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Este estágio tem uma enorme relevância na nossa formação enquanto profissionais de saúde, permitindo-nos o contacto direto com os utentes e transpor os casos clínicos estudados na faculdade, para casos clínicos reais, formando assim a nossa identidade profissional e promovendo a aquisição de aptidões sociais, humanas e éticas.

O meu estágio curricular em farmácia comunitária foi realizado na Farmácia Santa Isabel, em Coimbra. Aqui fui acompanhada e orientada de forma exemplar pela Dra. Ana Sofia Lopes Baptista, juntamente com a restante equipa: Dra. Ana Vaz, Dra. Ana Rodrigues, Sr. Rui Borges e Sr. Rui Costa. Esta fantástica equipa de trabalho não só me transmitiu conhecimentos fundamentais para o meu futuro como farmacêutica, como também me ajudou a ultrapassar os desafios do dia-a-dia.

Tendo em conta os critérios definidos nas Normas Orientadoras de Estágio Curricular do MICF, o presente relatório tem como finalidade descrever as atividades

desenvolvidas e os conhecimentos adquiridos durante o estágio. Este deve ser elaborado sob um ponto de vista crítico, através de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*).

2. ANÁLISE SWOT

A análise SWOT tem duas dimensões: a interna, que é constituída pelos pontos fortes (*strengths*) e os pontos fracos (*weakness*), e a externa, que inclui as oportunidades (*opportunities*) e as ameaças (*threats*). Concluída a análise, pretende-se que as *Weakness* se transformem em *Strengths*, e que estes sejam protegidos, assim como as *Threats* se tornem *Opportunities*.

O meu objetivo é realizar esta análise tendo como referência a finalidade do estágio que realizei.

2.1. PONTOS FORTES

Localização da farmácia

A Farmácia Santa Isabel localiza-se na Avenida Sá da Bandeira, nº28, Sé Nova, numa zona central da cidade de Coimbra. A sua localização e a proximidade a determinados pontos históricos e característicos da cidade, como o Mercado Municipal D. Pedro V, a Praça da República, o Pólo I da Universidade de Coimbra e a baixa da cidade, fazem com que a população de utentes que frequenta a farmácia seja muito heterogénea. Este vasto grupo de utentes permitiu-me aumentar os meus conhecimentos, uma vez que os atendimentos não se destinavam só a uma faixa etária, género ou condição social. Tive assim a oportunidade de desenvolver a capacidade de adequar o meu discurso e a minha postura consoante o público-alvo. Isto é muito importante, uma vez que é necessário conseguirmos compreender as razões que trazem o utente à farmácia e conseguirmos aconselha-lo da melhor forma possível. Foi muito interessante ter uma visão de dois grupos bastante diferentes, os turistas e os idosos. Enquanto que com os turistas temos de tentar fazer um aconselhamento o mais rápido e conciso possível, com os idosos acontece o contrário. Com estes não basta apenas referir as informações estritamente necessárias para a utilização do medicamento e/ou produto, é necessário ter um discurso mais calmo, explicar bem as posologias, escreve-las nas embalagens e, muitas vezes, perguntar se percebeu tudo bem e repetir outra vez de forma a que não existam problemas com a toma/colocação dos medicamentos e/ou produtos. Com os idosos temos de ter uma atenção reforçada e um cuidado especial.

Preparação de Medicamentos Manipulados

Um medicamento manipulado “é qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”. As formas magistrais são preparadas na farmácia comunitária, segundo uma receita médica onde é especificado o doente a quem o medicamento se destina. Os preparados oficinais são preparados segundo as indicações de uma farmacopeia ou de um formulário e são dispensados diretamente a doentes assistidos pela farmácia. Para que uma receita de um medicamento manipulado seja aceite é imperativo que esta tenha a designação FSA (*Fac Secundum Artem*) ou a palavra “manipulado” (Infarmed, 2004).

Os medicamentos manipulados resultam da necessidade de adaptar a terapêutica de um determinado utente, em caso de não existir nenhuma alternativa no mercado disponível, que satisfaça os requisitos face a: substância ativa (s.a.) ou combinação de s.a., dose adaptada à indicação terapêutica e características metabólicas do doente ou intolerância a um ou mais componentes da fórmula industrial. A preparação destes medicamentos pelos farmacêuticos permite então responder às necessidades especiais de doentes individualizados, sendo estes, portanto, os responsáveis não só pela sua preparação, mas também pela garantia da sua qualidade (Objetivo, Responsabilidades e Enquadramento, 2018).

Durante o estágio, tive a oportunidade de preparar uma Pomada de Ácido Salicílico a 5% (Ficha de preparação – Anexo I).

Estas preparações de manipulados permitiram-me ainda perceber como é que se calcula o PVP (preço de venda ao público) dos medicamentos manipulados. Este é redigido pela Portaria n.º769/2004, de 1 de junho, que estabelece que “O cálculo do preço de venda ao público dos medicamentos manipulados por parte das farmácias de oficina obedece ao disposto na presente portaria e é efetuado com base no valor dos honorários da preparação, no valor das matérias-primas e no valor dos materiais de embalagem”. Um ponto importante nesta portaria e que é determinante para o PVP é o fator F, cujo valor é atualizado anualmente com base no crescimento do índice de preços ao consumidor através dos dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) para o ano anterior. Este é multiplicado em função das formas farmacêuticas e das quantidades preparadas (Infarmed, 2004).

Em relação à comparticipação destes medicamentos, os medicamentos manipulados comparticipados constam numa lista que é aprovada anualmente e são comparticipados em 30% do seu preço (Ministério da Saúde, 2010).

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de perceber o que deve ser feito quando existem dúvidas na preparação de um medicamento manipulado. Quando existem dúvidas no protocolo deve-se contactar o LEF (Laboratório de Estudos Farmacêuticos), por via telefone ou por correio eletrónico, que disponibilizará o protocolo via correio eletrónico, adequando a cada situação, as matérias-primas, os materiais utilizados e os passos a seguir.

Considero que a preparação destes manipulados foi sem dúvida um dos pontos fortes do meu estágio, pois estes permitem satisfazer as necessidades de um utente da farmácia que a indústria não consegue. É uma atividade farmacêutica que valoriza o papel do farmacêutico e que demonstra a sua necessidade na sociedade.

Aconselhamento em Preparações de Uso Veterinário

O farmacêutico é o especialista do medicamento, tendo diversas funções, nas quais se inclui a dispensa de medicamentos veterinários. Os medicamentos veterinários são classificados quanto à sua dispensa em: a) Medicamentos não sujeitos a receita médico-veterinária; b) Medicamentos sujeitos a receita médico-veterinária; c) Medicamentos de uso exclusivo por médicos veterinários. A venda de medicamentos veterinários é efetuada pelas farmácias ou por outras entidades legalmente autorizadas. É importante diferenciar os medicamentos veterinários dos produtos de uso veterinário (PUV). Um PUV é: “a substância ou mistura de substâncias, sem indicações terapêuticas ou profiláticas, destinada a: a) animais, para promoção do bem-estar e estado higieno-sanitário, coadjuvando ações de tratamento, de profilaxia ou de manejo zootécnico, designadamente o da reprodução; b) ao diagnóstico médico-veterinário; c) ao ambiente que rodeia os animais, designadamente às suas instalações”. Os PUV não são sujeitos a receita médico-veterinária (Partes, Partes e Parte, 2009).

A Farmácia Santa Isabel não se restringe à dispensa de MSRM e MNSRM ou a outros produtos de saúde, pelo contrário, esta é reconhecida pelo notável aconselhamento na área de veterinária. Esta farmácia é considerada um estabelecimento de preferência para a aquisição destes produtos, tendo um segmento veterinário bastante completo. Este reconhecimento deve-se não só por ter fornecedores de confiança, que asseguram o rápido aprovisionamento sempre que possível de todos os produtos necessários, mas também por ter profissionais altamente qualificados que têm extensos conhecimentos baseados em informações tecnocientífica e na experiência.

Hoje em dia, existe uma crescente preocupação por parte dos utentes com a saúde dos seus animais de estimação, assim como uma preocupação em proteger a saúde da população em geral, no caso dos animais para consumo Humano. Como tal é muito

importante que o farmacêutico tenha um conhecimento aprofundado sobre esta área, sobretudo sobre a desparasitação interna dos animais de estimação, bem como dos animais para consumo Humano, como caprinos, ovinos, suínos e aves. Para além da desparasitação, é importante o domínio das metodologias que o farmacêutico deve aplicar nas doenças que são consideradas mais comuns nos animais de estimação, como dermatites e alergias, e mesmo na profilaxia de outras doenças como a mixomatose e a doença hemorrágica nos coelhos.

Durante o estágio fui confrontada com imensos casos, como por exemplo, desparasitação interna e externa em animais de estimação e suplementos alimentares para animais. No início do estágio senti muitas dificuldades em conseguir responder ao que me era pedido. No entanto, hoje sinto que evolui bastante, tendo sido este estágio fundamental para complementar a formação nesta área, enquanto profissional de saúde, preparando-me para enfrentar situações semelhantes no futuro. O conhecimento que adquiri nesta área foi um dos pontos fortes do meu estágio nesta farmácia, uma vez que esta foi uma vertente pouco explorada durante a minha formação académica.

SIFARMA 2000®

O modelo informático utilizado pela farmácia é o SIFARMA 2000®. Este *software* foi desenvolvido pela Associação Nacional de Farmácias (ANF) e é disponibilizado e assistido pela Glintt. Este *software* é, na maior parte das farmácias, a ferramenta mais utilizada pelo farmacêutico. Este é indispensável e muito útil na organização e gestão da farmácia. Praticamente todas as tarefas realizadas na farmácia dependem da utilização do SIFARMA 2000®, entre as quais temos: a realização e a receção de encomendas, devoluções, gestão de stocks, controlo dos prazos de validade, preço dos produtos, faturação, atendimento e aconselhamento farmacêutico. A nível do atendimento, o SIFARMA 2000® tem diversas funcionalidades que nos permitem aceder facilmente e com rapidez a informação não só a cerca do medicamento a ser cedido, mas também a cerca do historial do utente, de forma a satisfazer melhor e de forma mais rápida as necessidades do utente. Entre outras informações úteis, o SIFARMA 2000® permite-nos aceder ao grupo homogéneo dos medicamentos, criar fichas de utentes onde fica registada toda a informação do utente, nomeadamente, a medicação que toma, para facilmente ser possível avaliar a sua terapêutica anterior ou em curso, tornando possível a deteção de efeitos secundários, interações medicamentosas e ainda contra-indicações.

Apesar de inicialmente ter tido algumas dificuldades em trabalhar com o *software*, este acabou por ser uma grande ajuda, facilitando, agilizando e rentabilizando a execução das

minhas tarefas, ao longo de todo o estágio. Considero que a aprendizagem que fiz e o domínio que neste momento tenho do programa constituem uma grande vantagem para o meu futuro.

SIFARMA®

A Farmácia Santa Isabel foi, durante grande parte do meu estágio, farmácia piloto do novo *software* da ANF, o SIFARMA®. Este programa informático é uma versão melhorada do atual SIFARMA 2000®, estando apenas disponível o módulo de atendimento. A grande mudança que encontrei neste *software* é a de não existir a receita suspensa. Neste programa existem apenas dois tipos de vendas: Medicamentos comparticipados e os Medicamentos comparticipáveis. É um programa bastante intuitivo.

Para mim, um dos aspetos mais positivos neste novo programa é o facto de numa mesma venda conseguirmos fazer várias vendas de utentes diferentes e separar as devidas faturas, de forma a que cada produto seja passado no nome do utente. Penso que ter participado neste projeto piloto foi muito enriquecedor para a minha aprendizagem, tendo feito o curso online na escola da ANF.

Back-office

O *back-office* tem uma extrema importância numa farmácia. Este inclui tarefas relacionadas com o aprovisionamento, fornecedores, encomendas, devoluções, armazenamento, prazos de validade, revisão do receituário e faturação. Para o bom funcionamento e sustentabilidade de uma farmácia é essencial a capacidade de organização.

Com este estágio, apercebi-me do quão importante é o *back-office*. Eu acredito que sem uma boa gestão, nada iria funcionar bem. Na Farmácia Santa Isabel, tive a oportunidade de aprender e fazer quase todas as tarefas do *back-office* e de presenciar a ótima organização que esta farmácia tem por detrás do balcão. Percebi que se no *back-office* alguma coisa corre mal, isso reflete-se imediatamente ao balcão. Acho que a minha aprendizagem nesta área foi um ponto forte, uma vez que me fez perceber a quantidade de tarefas que existem para fazer, para que uma farmácia consiga seguir em frente e ser organizada.

2.2. PONTOS FRACOS

Localização

A Farmácia Santa Isabel encontra-se numa zona de passagem, perto de paragens de autocarros e com pouco estacionamento nas redondezas. Apesar de este facto permitir uma população de utentes heterogénea, também faz com que, muitas vezes, as pessoas venham

com pouco tempo à farmácia e não nos deixem explicar tudo como deve ser. Temos, por vezes, de referir apenas a informação estritamente necessária, mesmo quando o utente demonstra que não é conhecedor da medicação que vai fazer. Acredito que isto é um aspeto negativo para os utentes, uma vez que com as suas vidas agitadas possam, por vezes, perceber mal o que lhes é comunicado, o que pode levar a vários problemas de saúde. É necessário que a população em geral, perceba que as informações cedidas na farmácia são muito importantes e que estas podem, muitas vezes, prevenir várias complicações, como a toma em duplicado, a sobredosagem, a má aplicação/toma da medicação, entre outros.

SIFARMA®

O SIFARMA® é, supostamente, uma versão melhorada do SIFARMA 2000®. No entanto, como ainda está em projeto piloto, tornou-se um bocado complicado usar este *software*. Este programa era lento e bloqueava bastantes vezes. Para mim, o maior defeito é que, apesar de tudo o que era feito neste programa ficava memorizado no SIFARMA 2000®, o contrário não acontecia. Ou seja, sempre que tínhamos um atendimento no novo programa, tínhamos de abrir a ficha do utente no antigo para conseguirmos ver a sua medicação habitual. Isto acabava por tornar o atendimento muito mais lento e, por vezes, os utentes ficavam “irrequietos” com a demora.

Inexperiência na receita manual

Durante o decorrer do meu estágio, não tive muitas oportunidades de entrar em contacto com receitas manuais. Penso que este foi um ponto fraco do meu estágio, sendo um dos pontos onde tive mais dúvidas e receio de fazer sozinha. Enquanto que nas receitas eletrónicas o sistema interpreta automaticamente a receita, nas manuais isso não acontece. Estas receitas exigem muita atenção, uma vez que é da total responsabilidade do farmacêutico a dispensa dos medicamentos corretos, na quantidade certa, com o respetivo plano de comparticipação, baseando-se única e exclusivamente na leitura da receita. Para mim, este é o aspeto mais difícil de todos, a leitura da receita. Senti sempre a necessidade de pedir auxílio a alguém da equipa para ter a certeza de que tinha feito uma boa leitura da receita, de forma a não dispensar o medicamento errado ao utente.

Estatuto de estagiário

O estágio curricular é a etapa final do nosso percurso académico e, como tal, pressupõe-se que os alunos estejam preparados para enfrentar as diversas problemáticas em que seja necessário um aconselhamento farmacêutico personalizado face à situação que têm nas mãos. Tendo em conta estes aspetos, senti que durante o estágio alguns utentes sentiam

alguma insegurança ao serem atendidos por uma estagiária. Apesar de já estar preparada para isso, não pensei que fosse acontecer tantas vezes. Acho que é normal os utentes agirem assim no início, até porque no início acredito que nós deixemos passar um pouco a sensação de insegurança e de medo do atendimento que estamos a fazer. No entanto, chega uma altura em que já nos sentimos seguros e, mesmo assim, os utentes sentem-se inseguros connosco, chegando alguns a negar a ajuda dos estagiários e a optarem por um membro da equipa da farmácia. Isto apenas reflete a maneira como a população no geral olha para todos os estagiários, de qualquer área. Considero importante desmitificar o conceito de que os estagiários não estão preparados, bem como promover a ideia de que o estágio, sob acompanhamento, permite ao estagiário alcançar a experiência necessária para o aconselhamento farmacêutico.

2.3. OPORTUNIDADES

Ao longo do estágio foram várias as oportunidades que me apareceram. A oportunidade de aprender a desempenhar as funções de farmacêutica foi, sem dúvida, muito enriquecedora. A integração na equipa foi essencial para a minha aprendizagem e evolução.

Aquisição de novos conceitos

Durante o meu estágio na Farmácia Santa Isabel, foram inúmeras as oportunidades que tive de estar presente em diversas formações que permitiram consolidar os conhecimentos adquiridos na faculdade. Particpei em formações sobre: Desparasitação Cão e Gato – a importância da desparasitação e zoonoses; Deficiência de Selénio em Portugal; “*Oral Care*” da Pierre Fabre; a gama da Caudalie; Polimedicação no Idoso; Emplastro de eletroterapia; Proteção Solar; Olho seco e alergia ocular; entre outros.

Paralelamente, os delegados de informação médica são, hoje em dia, uma das fontes de conhecimento na área da inovação em saúde. É fundamental que os farmacêuticos se mantenham sempre em contacto com todas as inovações em saúde, sendo para isso importante manter uma relação próxima com os delegados de informação médica. No decorrer do estágio, tive também a oportunidade de estar presente nas formações dadas na farmácia, através dos delegados, sobre diversos produtos, como: DualCare[®], HidraCare[®], Magnesona Zero[®], Effitix[®], Symparica[®], Ocryl[®], vários produtos da gama da Bioactivo, como Selénio, Glucosamina Duplo e Vitamina D, entre outros.

Todas estas formações permitiram-me conhecer as propriedades, as características e a forma de utilização dos vários produtos, dando-me suporte no atendimento, de forma a

este ser correto, fluido, perceptível e dando-me a possibilidade de esclarecer qualquer dúvida que o utente tenha ou venha a ter.

Acompanhamento Farmacoterapêutico

A polimedicação dos utentes mais idosos está cada vez mais presente, devida ao aumento da esperança média de vida. Esta pode acarretar riscos para a saúde dos utentes, razão para que estes sejam devidamente acompanhados por um profissional de saúde. O farmacêutico, como especialista do medicamento, é o profissional de saúde com mais competências para fazer um bom acompanhamento da medicação dos seus utentes.

A implementação destes serviços na farmácia comunitária torna-se, a cada dia que passa, uma necessidade. É um serviço que permite detetar vários erros e prevenir vários problemas de saúde. É importante que os utentes mais necessitados, como os idosos, devido às suas comorbilidades, possam ter alguém que assegure a segurança da sua medicação.

Este serviço é uma oportunidade para os farmacêuticos, na medida em que estes podem mostrar a sua importância no dia-a-dia da população e podem aumentar a sua proximidade aos utentes, mostrando preocupação e atenção para com a saúde e o bem-estar destes. O utente vai sentir que tem alguém capaz de o acompanhar em toda esta situação, acabando por se fidelizar com maior facilidade.

Entrega de medicamentos ao domicílio

A impossibilidade de deslocação à farmácia faz com que a entrega de medicamentos ao domicílio esteja a alcançar popularidade entre os utentes. Esta impossibilidade de deslocação mostra-se como um fator de risco para a não adesão à terapêutica, o que compromete a eficácia do tratamento. Este é um serviço emergente, que pode combater este fator de risco.

Ao longo do meu estágio, presenciei a aplicação deste serviço. Existem inúmeras pessoas, nomeadamente alguns idosos, que por morarem sozinhos e terem algumas dificuldades na mobilidade, não conseguem deslocar-se à farmácia. A Farmácia Santa Isabel é uma farmácia que tem como primeiro plano os seus utentes e tenta de todas as formas diminuir a não adesão à terapêutica, de forma a melhorar a saúde e o bem-estar dos seus utentes.

Tive também a oportunidade de acompanhar a cedência de medicamentos a uma casa de acolhimento, que a Farmácia Santa Isabel fornece. Sempre que um medicamento é pedido, a equipa da farmácia separa a medicação por utente, tendo sempre o cuidado de escrever a posologia que o utente deve fazer, e, assim que possível, a medicação é levada à casa de acolhimento.

Com este estágio percebi a importância que este serviço tem na vida dos utentes e como é importante no combate à não adesão à terapêutica devida à impossibilidade de deslocação. Apesar de toda a organização necessária para por este serviço em prática, acredito que este seja uma oportunidade para as farmácias conseguirem ter um papel ativo na vida dos utentes mais carenciados e com mais dificuldades de mobilidade, conseguindo também fidelizar os utentes.

Medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF)

Os medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia são um subgrupo dos medicamentos não sujeitos a receita médica. Atualmente, os MNSRM não são vendidos apenas em farmácias, mas sim em vários postos, como as parafarmácias e os estabelecimentos de grande superfície. Como nestes postos de venda não existem farmacêuticos, a venda de MNSRM torna-se perigosa, podendo levar à automedicação e a erros de medicação. Para que haja algum controle na venda destes medicamentos, surgiu um subgrupo que apenas pode ser vendido nas farmácias.

Este grupo de medicamentos é uma nova oportunidade para as farmácias, na medida que previne maus aconselhamentos e que permite às farmácias agarrar neste novo grupo e combater o aumento dos outros postos de venda. Esta é sem dúvida uma oportunidade que as farmácias devem agarrar de forma a torna-la num ponto forte das farmácias e num ponto fraco dos restantes postos de venda de MNSRM.

2.4. AMEAÇAS

A venda de MNSRM em parafarmácias e nas grandes superfícies

A venda de MNSRM em parafarmácias e nas grandes superfícies está a aumentar cada vez mais. Apesar do atendimento nestes locais ser feito, por vezes, por pessoas sem formação e qualificação científica necessária para poder aconselhar de forma apropriada, a população está cada vez mais a recorrer a estes estabelecimentos. Uns por saberem que os preços são, normalmente, mais baixos, outros por não saberem que estão a ser atendidos por uma pessoa sem formação adequada.

Atualmente, é muito difícil competir com os PVP dos produtos vendidos nestas grandes superfícies. Estes estabelecimentos são, não só, uma grande ameaça à sustentabilidade das farmácias, como também um perigo para a saúde da população, uma vez que podem levar ao uso incorreto destes medicamentos e/ou a uma automedicação irresponsável e sem vigilância.

Profissionais sem habilitações científicas na área de farmácia ao balcão

Atualmente, com a banalização das parafarmácias, surgiram novas profissões no mundo farmacêutico, em especial os técnicos auxiliares de farmácia. Estes técnicos são responsáveis por auxiliarem os farmacêuticos na receção de encomendas, compras e distribuição de medicamentos. No entanto, estes técnicos podem trabalhar noutros locais de venda de MNSRM, como as parafarmácias, sem qualquer auxílio de um farmacêutico. Apesar da sua curta formação, estes aconselham estes medicamentos aos utentes sem terem conhecimentos científicos suficientes para isso, não podendo fazer um aconselhamento seguro e responsável.

O aparecimento destas novas profissões são, sem dúvida, uma grande ameaça aos farmacêuticos. Para além de tirarem o lugar de um farmacêutico, estes tornam a procura de emprego mais difícil, uma vez que estes, por norma, são contratados a um custo mais reduzido. Apresenta-se também como uma ameaça à prática farmacêutica, uma vez que estes não têm a capacidade de fazer um aconselhamento seguro e responsável, podendo por o utente em risco.

Automedicação e publicidade de MNSRM

A automedicação é um dos maiores problemas da atualidade. O uso de medicamentos para o alívio de sintomas, quer por conta própria, quer por recomendação de pessoas não habilitadas, representa um perigo para a saúde pública. A atitude irresponsável de se automedicar, quer seja por conta própria, por recomendação de outrem ou por ter sido influenciado por publicidade, está cada vez mais presente no dia-a-dia. O farmacêutico tem um papel muito importante neste assunto. Este deve avaliar se o MNSRM pedido é o mais indicado para aquele utente e para aquela condição e deve saber explica-lo ao utente. É muito importante que os utentes percebam que um medicamento que tenha tido efeito a um utente, pode não ser o mais adequado para outro. A automedicação é uma ameaça à atividade farmacêutica, cabendo ao farmacêutico o papel de desmitificar a ideia do medicamento perfeito e de promover o uso racional dos medicamentos.

3. CONCLUSÃO

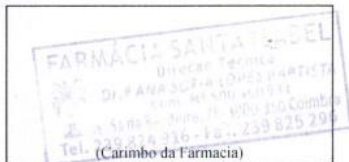
O estágio curricular é o fim de uma etapa das nossas vidas, é o momento em que todos os nossos conhecimentos são aplicados e consolidados, é a altura de adquirir novos conhecimentos e de perceber como é a realidade profissional, que a partir deste momento vai passar a ser a minha nova realidade.

Este estágio foi uma experiência incrível, onde consegui aprender e desenvolver não apenas competências profissionais, mas também competências humanas, que são essenciais para o meu futuro, não só como farmacêutica, mas também como pessoa. Durante estes meses consegui entender o papel do farmacêutico na sociedade e o impacto que este tem na saúde pública. O farmacêutico não é apenas um especialista do medicamento, mas sim um agente de saúde pública centrado no doente. Este profissional de saúde é muitas vezes o primeiro contacto que o utente tem, o que permite criar laços de proximidade entre a população e o farmacêutico. Esta proximidade leva à confiança, o que permite que o farmacêutico consiga promover um uso racional dos medicamentos.

O sucesso desta minha última etapa enquanto aluna, apenas foi possível graças à fantástica equipa da Farmácia Santa Isabel e à forma como me acolheram e me ajudaram em tudo o que podiam. Esta equipa ensinou-me imenso e incentivaram-me sempre a ser mais e melhor. Durante todo o meu estágio tive presente a frase da Farmácia Santa Isabel “Para melhorar é preciso mudar. Para ser perfeito é preciso mudar constantemente”, que levarei comigo. Graças a toda a experiência que adquiri durante este estágio, encaro o meu futuro como farmacêutica de uma forma positiva e tentarei nunca esquecer de mudar, mudar constantemente!

ANEXO I

Ficha de Preparação de Manipulados



Ficha de Preparação de Manipulados

FARMACIA SANTA ISABEL
Coimbra

Medicamento: Vaselina salicilada a 5%

Teor em substância(s) activa(s): 100g contém 5 g de ácido salicílico

Forma farmacêutica: Pomada Propriamente Dita Data de Preparação: 26-01-2018

Número do lote: 03/18 Quantidade a preparar: 100g

Matérias-primas	Lote nº	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100g	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do Operador e data	Rubrica do Supervisor e data
Vaselina						95g	AS	
Ácido salicílico						5g	AS	

Preparação:

Rubrica do Operador

1. Limpar o material.	AS
2. Pesar das materia primas.	AS
3. Incorporar gradualmente o acido salicilico à vaselina.	AS
4. Espatular até completa incorporação do principio activo.	AS
5. Transferir para a embalagem.	AS
6. Limpar o material.	AS

Aparelhagem usada:

Espátulas, balança, placa de espatulação

Embalagem:

Material da embalagem	Nº do lote	Origem
Plástico		

Prazo de utilização e Condições de conservação:

Condições de conservação:

Local seco e fresco

Operador

Prazo de utilização:

3 meses

Operador

Rotulagem

1. Procedeu-se à elaboração de rotulo de acordo com o modelo definido.

Verificação

Ensaio		Especificação	Resultado	Rubrica do Operador
Caractères organolépticos	1.1. cor	Branco	conforme	
	1.2. aspecto	Homogéneo	conforme	
	1.3. cheiro	Inodoro	conforme	
Uniformidade de massa		+/- 5%	conforme	
Homogeneidade		Homogéneo	conforme	

Aprovado

Rejeitado

Supervisor: AA

Data: 26 / 1 / 18

Nome e Morada do doente

Nome do prescriptor

Anotações

Pag. 2/3

Rubrica do Director Técnico	Data
-----------------------------	------

Cálculo do preço de venda

MATÉRIAS-PRIMAS:

matérias-primas	embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/IVA)		quantidade a usar	factor multiplicativo	valor da matéria-prima utilizada na preparação	
	quantidade adquirida	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade unitária	preço				
Ac. Salicilic	100	1,41	100	0,0141	x 5	x 2,2	= 0,163	
Vanilina	1000	4,48	100	0,00448	x 95	x 1,9	= 0,81	
					x	x	=	
					x	x	=	
					x	x	=	
					x	x	=	
					x	x	=	
subtotal A								0,97

HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:

	forma farmacêutica	quantidade	F (€)	factor multiplicativo	valor
valor referente à quantidade base	Parado pp. dil.	100	4,98	x 3	= 14,94
valor adicional			x	x	=
subtotal B					14,94

MATERIAL DE EMBALAGEM:

materiais de embalagem	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade	factor multiplicativo	valor
Pólo	0,5	x 1	x 1,2	= 0,60
Unqutor	1,15	x 1	x 1,2	= 1,38
		x	x 1,2	=
		x	x 1,2	=
subtotal C				1,98

PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO:

(A + B + C) x 1,3 = 23,26
 + IVA 6% = 24,65
D 24,65

DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:

dispositivo	preço unitário	quantidade	valor

E _____

PREÇO FINAL: D + E _____

Operador: _____

Supervisor: _____

Rubrica do Director Técnico	Data
-----------------------------	------

Guia de tratamento para o utente

Receita Médica N.º: 

Local de Prescrição: HUC - Consulta Externa
 Médico Prescritor:  Telefone: 
 Ubanita:  Código Direito Opção: 

(Integradas a utilizar para dispensa de medicamentos no farmácia)
 DCI / Nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia

1 **vaselina salicilada a 5% 100 grmas fca e mande em caixa**
 Posologia - à noite

2


3



4




Para obter mais informações sobre o preço dos medicamentos:
 • Consulte a Ficha do Medicamento, no site do INFARMED (www.infarmed.pt)
 • Contacte a Linha de Medicamentos 800 222 444 (Das 08h às 14h e 14h às 17h30)
 • Fale com o seu médico ou farmacêutico

Data: 2018-01-08
 Processado por computador - Guia de prescrição, versão 6.0 - GINEMHS

Receita Médica N.º

Ubanita: 

Ubanita:  R.C.: 
 Entidade Responsável: SNS

N.º de Beneficiário:  HUC - Consulta Externa
 Especialidade: Dermatovenerologia
 Telefone:  Identificação Orda: 

R DCI / Nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia N.º Extensão
 1 **vaselina salicilada a 5% 100 grmas fca e mande em caixa 1 Uba**
 Posologia - à noite

2

3

4

Validade: 30 DIAS
 Data: 2018-01-08
 (Assinatura do Médico Prescritor)

ANEXO II

Caso prático I – criança de 7 anos

Tendo em conta a altura em que decorreu o meu estágio, foram inúmeros os casos de aconselhamento de pessoas com sintomas de constipação.

Um dos casos que me apareceu na farmácia foi o de uma mãe que referiu que o filho, de 7 anos, apresentava sintomas recentes de dores de garganta e nariz entupido. Iniciei o meu atendimento por aconselhar um spray nasal de lavagem à base de água do mar com pH isotónico, de forma a facilitar a lavagem e a respiração da criança, tendo em conta que uma das principais queixas que a mãe referiu foi a do menino não conseguir dormir bem por causa do nariz estar entupido. Para as dores de garganta recomendei umas pastilhas Strepsils® Laranja com Vitamina C com um intervalo mínimo de 3 em 3 horas e durante 3 dias. Estas pastilhas não vão só aliviar a dor, graças às substâncias ativas que possuem propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e anestésicas locais, como vão também ajudar no sistema imunitário da criança, graças à vitamina C. Estas pastilhas podem ser tomadas por crianças com mais de 6 anos, estando então indicadas para esta criança. Alertei ainda a mãe da criança para o caso de se não haver melhorias durante 2-3 dias, que o devia levar ao médico.

Caso prático II – veterinária

A procura de produtos de veterinária na Farmácia Santa Isabel é grande, o que me permitiu fazer alguns aconselhamentos de produtos de veterinária.

Numa tarde, entrou na farmácia um senhor com cerca de 50 anos, que me pediu Milbemax® para o seu cão. Milbemax® é um desparasitante interno composto por Praziquantel e Milbemicina. O Praziquantel tem ação nos nemátodos e a Milbemicina tem ação na prevenção da Dirofilariose. A Dirofilariose é uma doença que atinge sobretudo os cães e é transmitida por um mosquito que deposita larvas do parasita Dirofilaria no sistema hemolinfático. As larvas migram para os tecidos subcutâneos e dão origem a jovens adultos que se vão alojar ao nível das artérias pulmonares e no coração, cerca de 4 meses após a infeção. Se o cão estiver contaminado e fizer um desparasitante como o Milbemax®, as larvas vão morrer no local onde se encontrarem, o que pode levar à formação de trombos, podendo sofrer insuficiência cardíaca, que pode levar à morte.

Após o pedido do desparasitante, a primeira coisa que fiz foi perguntar se o cão já fazia o Milbemax[®] ou se era por indicação do veterinário. O senhor respondeu-me que sim, que o veterinário lhe tinha indicado já há bastante tempo, mas que nos últimos 6 meses se tinha esquecido de dar. Eu alertei-o para o perigo em que poderia estar a colocar o seu cão, pois é fundamental que sejam feitos exames aos cães antes de iniciar a toma deste desparasitante, de forma a ter a certeza de que estes não estejam contaminados. Apesar do seu cão já fazer este desparasitante, este deve ser tomado todos os meses e no caso de haver uma pausa, como aconteceu, o cão deve fazer primeiro exames antes de voltar a toma-lo, pelo que o aconselhei a ir ao veterinário ou a optar por outro desparasitante interno. Alertei-o ainda para o facto de a cidade de Coimbra ser um local endémico deste mosquito, sobretudo a zona do choupal à noite. O senhor disse-me que por acaso costumava ir passeá-lo para o choupal, agradeceu-me pelo esclarecimento e optou por marcar uma consulta no veterinário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Infarmed - Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de abril. *Legislação Farmacêutica Compilada* (2004) 1–4.

Infarmed - Portaria n.º 769 / 2004 , de 1 de Julho. *Legislação Farmacêutica Compilada* (2004) 4–7.

Ministério da saúde - Decreto-Lei nº106-A/2010, de 1 de Outubro. *Diário da República I:2* (2010) 4372(2)-4372(5).

Santos, H. J.; Cunha, I. N.; Coelho, P. V.; Cruz, P.; Botelho, R.; Faria, G.; Marques, C.; Gomes, A. - Boas práticas de farmácia comunitária 3 (2018) 1–9.

1.ª série – N.º 179 – 15 de Setembro de 2009. *Diário da República* (2009) 6354–6378.

PARTE II

O stresse oxidativo como estratégia terapêutica anticancerígena

Orientada pela:

Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANT – Adenina-nucleotídeo-translocase
- AP – Proteína antioxidante, *Antioxidant protein*
- APL – Leucemia Promielocítica Aguda, *Acute promyelocytic leukaemia*
- ARE – Elementos de resposta antioxidante, *Antioxidant responsive element*
- ASK – Cinase reguladora do sinal de apoptose, *Apoptosis signal-inducing kinase*
- ATO – Trióxido de Arsénio, *Arsenic trioxide*
- BSO – Butionina sulfoximina, *Buthionine sulfoximine*
- CAT – Catalase
- Cys – Cisteína
- CySS – Cistina
- DNA – Ácido desoxirribonucleico, *Deoxyribonucleic acid*
- E_h – Potencial fisiológico redox
- ETC – Cadeia de transporte de eletrões, *Electron transport chain*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- GSH – Glutaciona
- GSH-Px – Glutaciona peroxidase
- GSH-R – Glutaciona redutase
- GSH-T – Glutaciona transferase
- GS-SG – Glutaciona dissulfito
- HIF-1 α – Fator indutor de hipoxia – 1 α , *Hypoxia inducible factor, 1 α*
- MDR – Resistência a múltiplos fármacos, *Multi-drug resistance*
- MnSOD – Superóxido dismutase dependente de manganésio, *Manganese superoxide dismutase*
- NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado, *Nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form*
- NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, *Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form*
- NADP – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphat, oxidized form*
- NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphat, reduced form*
- NF- κ B – Fator nuclear κ B, *Nuclear factor κ B*
- NOX1 – NADPH oxidase 1
- Nrf2 – Fator nuclear derivado de eritroides 2, *Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*

PEITC – Isotiocianato de feniletilo, *β -phenylethyl isothiocyanate*

P-gp – Glicoproteína-P, *P-glycoprotein*

Prx – Peroxirredoxina

PT – Permeabilidade transitória

REF1 – Fator redox-I, *Redox-factor 1*

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio, *Reactive nitrogen species*

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio, *Reactive oxygen species*

SOD 2 – Superóxido dismutase 2

SOD 1 – Superóxido dismutase 1

Srx – Sulfirredoxina

STAT3 – Transdutores de sinais e ativadores da transcrição 3, *Signal transducer and activator of transcription 3*

TFD – Terapia fotodinâmica

Trx – Tiorredoxina

TrxR – Tiorredoxina redutase

TrxSS – Tiorredoxina dissulfito

Vit. C – Vitamina C – Ácido ascórbico

Vit. E – Vitamina E – α -tocoferol

XOD – Xantina oxidase

RESUMO

O cancro é uma doença que, atualmente, atinge o mundo inteiro. Existem milhões de pessoas a viver com o diagnóstico de cancro. O aumento da incidência tem várias causas, desde o aumento da esperança média de vida, às mudanças do estilo de vida.

A incidência desta doença levou a que a investigação nesta área aumentasse muito nos últimos anos. É necessário que esta investigação seja constante e que procure não apenas formas de deteção, mas também formas de prevenção e de tratamento, de forma a conseguir melhorar a qualidade de vida destes doentes durante e após o tratamento.

Atualmente, existem inúmeros tratamentos anticancerígenos, como a quimioterapia e a radioterapia. No entanto, é muito difícil conseguir um tratamento apropriado. Estas dificuldades têm várias origens, como por exemplo, a resistência à medicação e os efeitos colaterais. É imperativo estudar a evolução do cancro, as características das células cancerígenas e o que as distingue das células normais, de forma a conseguir-se fazer uma terapêutica individualizada.

A presente monografia explora os efeitos das espécies reativas de oxigénio nas células cancerígenas, com o propósito de serem usadas no tratamento do cancro. Descrevem-se algumas características das células cancerígenas e das espécies reativas de oxigénio. O seu foco é uma nova abordagem ao tratamento anticancerígeno com as espécies reativas de oxigénio, os prós e os contras desta terapia e as preocupações que existem na sua implementação. Por fim, é ainda comentado, de forma breve, o papel do farmacêutico no acompanhamento de doentes oncológicos.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigénio, Stresse oxidativo, Cancro, Antioxidantes, Terapia anticancerígena.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is a worldwide disease. There are millions of people living with the diagnosis of cancer. The raise of incidence has several causes, such as the increase of life expectancy and lifestyle changes.

Similarly, this increase of incidence has led to the investment of research on this area in recent years. Thereby, it is necessary to put into practice a constant research not only in forms of detection, but also in forms of prevention and treatment of cancer, in order to improve the quality of life of these patients, not only during treatment, but also after.

Today there are numerous anticancer treatments, such as chemotherapy and radiation therapy. However, it is very difficult to treat a cancer. These difficulties are based in problems such as resistance to medication and side effects. It is imperative to study the evolution of cancer, its characteristics, as in the characteristics of cancer cells versus normal cells, so that individualized treatment can be achieved.

The main objective of this manuscript is to explore the effects of reactive oxygen species on cancer cells, for the treatment of this disease. It will be described some of the characteristics of cancer cells and some of the characteristics of reactive oxygen species. The focus will be based on anticancer treatment with reactive oxygen species, advantages and disadvantages of this treatment and the concerns that exist in its implementation. Finally, the role of the pharmacist in monitoring cancer patients will be discussed.

Key words: Reactive oxygen species, Oxidative stress, Cancer, Antioxidants, Cancer therapy.

I. INTRODUÇÃO

As doenças oncológicas são a segunda causa de morte em Portugal e a que subiu mais nos últimos anos. Em 2014, a percentagem de mortes devido a cancro foi de 25 %, tendo as doenças do aparelho circulatório sido a primeira causa, com uma percentagem de 31 %. Assim, tal como no resto da Europa, tem-se assistido nos últimos anos, a um aumento regular da incidência das doenças oncológicas em Portugal, a uma taxa constante de, aproximadamente, 3 % por ano. Este aumento está relacionado, sobretudo, com o aumento da esperança média de vida e com as alterações dos estilos de vida. O aumento da esperança média de vida leva ao envelhecimento da população, aumentando assim a probabilidade de aparecimento de novos casos de cancro. Este envelhecimento é devido, principalmente, ao avanço da medicina, que se repercute essencialmente. As modificações do estilo de vida, nomeadamente, o tabaco, a exposição solar, os erros alimentares, a obesidade e o consumo excessivo de álcool têm elevado impacto na incidência do cancro, sendo necessário uma intervenção na educação dos cidadãos (Miranda *et al.*, 2016; Miranda *et al.*, 2017; Kumari *et al.*, 2018).

Devido à elevada incidência desta patologia, a procura de novas terapias é cada vez mais necessária.

Níveis elevados de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS) são, normalmente, prejudiciais para as células e o estado redox das células cancerígenas é geralmente diferente do estado redox das células normais. Devido a alterações no metabolismo e na sinalização, as células cancerígenas apresentam níveis elevados de ROS. Este aumento é equilibrado pelo aumento da capacidade antioxidante, o que demonstra que as ROS podem ser uma barreira para a carcinogénese. No entanto, estas podem também induzir a carcinogénese, através de mutações no DNA e nas vias de sinalização pró-oncogénicas. Esta contradição tem implicações importantes nas potenciais estratégias anticancerígenas, que têm como alvo a regulação dos níveis de ROS. É assim necessário, para o desenvolvimento racional de fármacos e para intervenções terapêuticas novas, um conhecimento mais detalhado dos mecanismos pelos quais o metabolismo induz toxicidade e stresse oxidativo nas células cancerígenas, ou vice-versa (Gorrini, Harris e Mak, 2013; Chaiswing, St Clair e Clair, St., 2018).

2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO

Os organismos aeróbios produzem, durante o metabolismo normal da célula, radicais livres, sobretudo na forma de espécies reativas de oxigénio (ROS). Quando estes produtos do metabolismo aeróbio são produzidos são, na sua maioria, neutralizados pelas defesas antioxidantes da célula, podendo estas ser enzimáticas ou não enzimáticas. Para o bom funcionamento do organismo, é necessário que haja um equilíbrio entre a produção e a eliminação dos radicais livres. No entanto, este equilíbrio pode ser destruído, quer por haver uma produção excessiva de ROS, quer por existir uma deficiência nas defesas antioxidantes. A este desequilíbrio dá-se o nome de stresse oxidativo. Quando os níveis de ROS estão elevados podem causar vários danos nos lípidos, nas proteínas e no DNA, acelerar o envelhecimento, levar a lesões degenerativas ou fatais nas células, que estão relacionadas com várias doenças, incluindo o cancro, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. No entanto, níveis moderados de ROS podem também ser benéficos para o organismo e podem participar em diversos processos fisiológicos, como por exemplo, atuarem como moléculas sinalizadoras da proliferação e da diferenciação celular; ativarem a resposta ao stresse oxidativo, como via de sobrevivência e, podem ainda atuar como moléculas sinalizadoras de transdução, que induz as citocinas pró-inflamatórias e a via do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Ferreira e Abreu, 2007; Glasauer e Chandel, 2014; Direção Geral da Saúde, 2017; Kumari *et al.*, 2018).

As espécies reativas de oxigénio são maioritariamente radicais livres derivados do oxigénio, que por apresentarem eletrões desemparelhados, apresentam uma forte reatividade com a maioria das espécies químicas. Incluem várias espécies reativas, como por exemplo, o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (HO^{\cdot}). O $O_2^{\cdot-}$ é considerado a ROS “primária” e resulta da adição de um eletrão ao oxigénio molecular (O_2). É produzido essencialmente na mitocôndria, onde ocorre uma pequena perda, mas contínua, de eletrões da cadeia respiratória. Estes eletrões em vez de reduzir o O_2 a H_2O , reduzem-no a $O_2^{\cdot-}$. (Figura 1) Apesar do anião superóxido não ser muito reativo, este pode interagir com outras moléculas e formar outros radicais que são designados por ROS “secundárias”, como por exemplo o H_2O_2 e o HO^{\cdot} . Quando o $O_2^{\cdot-}$ é formado, este é rapidamente convertido a H_2O_2 pelas superóxido dismutases 1 e 2 (SOD1 e SOD2). (Figura 1) As SODs previnem a acumulação do ião superóxido, que pode provocar danos e inativar as proteínas que contêm aglomerados de ferro-enxofre. A acumulação deste anião está então ligada ao stresse oxidativo e à sinalização redox. No entanto, é importante referir que esta espécie reativa não ataca indiscriminadamente as proteínas, mas sim um

conjunto específico de proteínas que são sensíveis à inativação por vias de sinalização ativadas pelo anião superóxido, que desenvolvem adaptações a níveis elevados desta espécie reativa ou que iniciam a apoptose. Apesar do radical hidroxilo ter uma semi-vida muito curta, é muito reativo e é a ROS que causa mais danos, pois oxida, indiscriminadamente, lípidos, proteínas e DNA, resultando em danos ou instabilidade genômica. O radical hidroxilo é formado a partir do H_2O_2 na presença de, por exemplo, ião ferro (ferroso). (Figura 1) Por esta razão, as células têm múltiplos mecanismos para manter a homeostase do ferro, de forma a prevenir a síntese desta espécie reativa (Ferreira e Abreu, 2007; Glasauer e Chandel, 2014; Schieber e Chandel, 2014; Redza-Dutordoir e Averill-Bates, 2016; Poprac *et al.*, 2017).

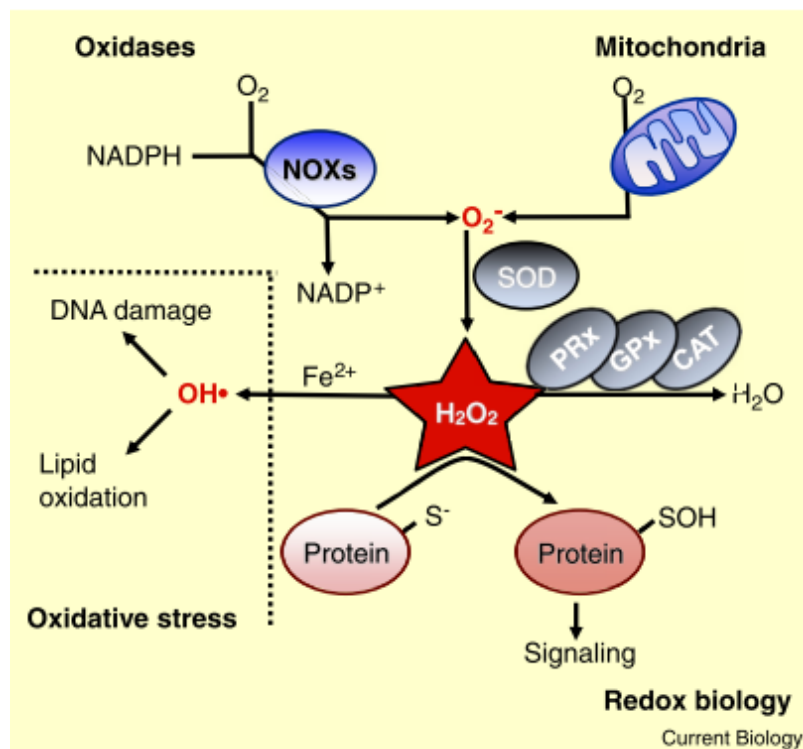


Figura 1. Esquema de formação de espécies reativas de oxigênio. Retirado de, Schieber e Chandel, 2014.

3. DEFESAS ANTIOXIDANTES DAS CÉLULAS

Uma vez que a produção de radicais livres não pode ser evitada nos organismos aeróbios, estes desenvolveram vários mecanismos de defesa para os eliminar. Estas defesas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. (Figura 2) Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas encontramos a glutathiona (GSH), o α -tocoferol (vit. E), o ácido ascórbico (vit. C). As defesas antioxidantes enzimáticas encontram-se em elevado número e distribuídas pelo organismo, tanto no meio intracelular como no extracelular. As enzimas antioxidantes mais importantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a glutathiona redutase (GSH-R) (Poprac *et al.*, 2017).

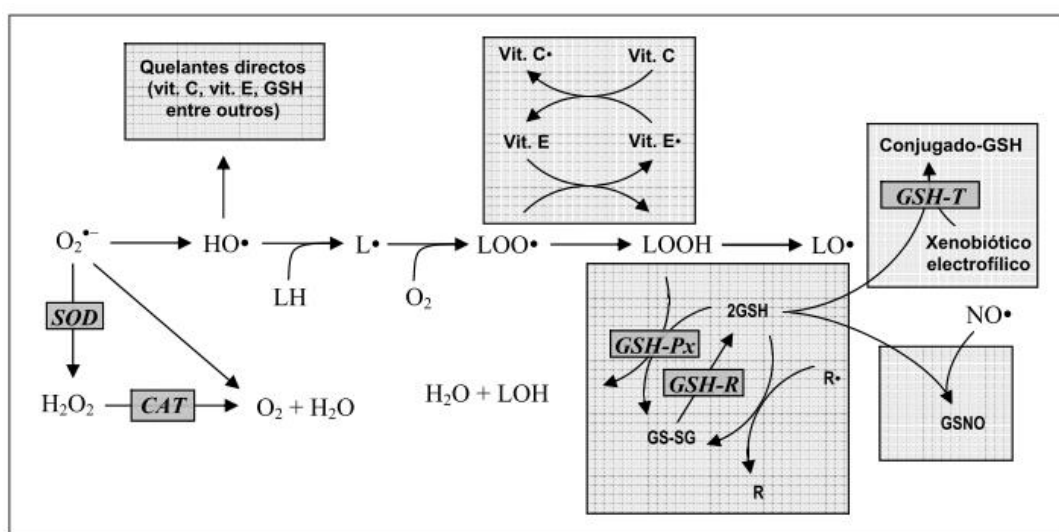


Figura 2. Principais defesas endógenas antioxidantes da célula
Retirado de, Ferreira e Abreu, 2007.

A superóxido dismutase converte o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que posteriormente é reduzido a água nos lisossomas pela catalase ou nas mitocôndrias pela glutathiona peroxidase. A glutathiona redutase atua de forma a regenerar a glutathiona (Glasauer e Chandel, 2014; Moloney e Cotter, 2017).

Estas enzimas atuam juntamente com pares redox para controlar os níveis de ROS. Uma célula contém, maioritariamente, 6 pares redox: NADH/NAD; NADPH/NADP; Cisteína (Cys) / Cistina (CySS); Glutathiona (GSH) / Glutathiona dissulfeto (GS-SG); Peroxirredoxina (Prx) / Sulfirredoxina (Srx); Tiorredoxina (Trx) / Tiorredoxina dissulfeto (TrxSS).

A glutathiona é um tripeptídeo de glutamato, cisteína e glicina, com um grupo tiol na cisteína e é muito abundante no organismo, sendo considerado o principal tampão redox

intracelular. Esta defesa antioxidante desempenha diversas funções, como por exemplo, neutraliza os radicais livres, atuando como cofator de algumas enzimas antioxidantes, como a glutationa peroxidase e a glutationa transferase (GSH-T). Durante a neutralização de radicais livres, a GSH é oxidada ao radical GS \cdot . Apesar deste radical ser reativo para qualquer molécula reage rapidamente com um segundo radical GS \cdot formando a glutationa dissulfito (GS-SG), que não é oxidante. Esta molécula é, posteriormente, reduzida pela GPH-R a duas moléculas de GSH. A glutationa é também usada para regenerar o estado ativo de outras moléculas antioxidantes, como a vitamina C e a vitamina E. Esta capacidade de regenerar outras moléculas está ligada ao estado redox do par Glutaciona / Glutaciona dissulfito (GSH/GS-SG) (Ferreira e Abreu, 2007; Kumari *et al.*, 2018).

As tiorredoxinas são proteínas que formam o par redox Trx/TrxSS. Este par desempenha um papel importante em muitos processos celulares, reduzindo dissulfuretos e protegendo muitas proteínas da oxidação. (Figura 3) Estas proteínas estão envolvidas na regulação de fatores de transcrição e influenciam a expressão genética (Bilan *et al.*, 2015).

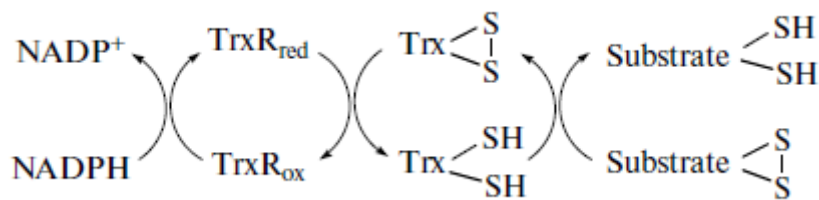


Figura 3. Princípio de funcionamento do par Trx/TrxSS. A tiorredoxina (Trx) reduz a ligação dissulfureto do substrato, ficando na forma oxidada (TrxSS). A redução da proteína é realizada pela tiorredoxina redutase (TrxR) dependente de NADPH. Imagem retirada de: Bilan *et al.*, 2015.

Cada par redox encontra-se em concentrações específicas nos compartimentos celulares e extracelulares, para cada tipo de célula humana, sendo a sua distribuição espacial não uniforme. A ordem de redução do estado redox é: mitocôndria > núcleo > citoplasma > retículo endoplasmático > espaço extracelular. O par GSH/GS-SG é muitas vezes usado como um indicador do ambiente redox celular. Este par consegue ativar/desativar moléculas com consequente alteração no potencial redox, que leva a diferentes estados biológicos, como por exemplo:

- Potencial redox: ~- 240 mV → leva à proliferação celular;
- Potencial redox: ~- 200 mV → leva à diferenciação celular;
- Potencial redox: ~- 170 mV → leva à iniciação da apoptose.

No entanto, é importante referir que este não é o único parâmetro que regula o potencial redox celular. A tioredoxina, a tioredoxina redutase (TR), a glutatona redutase (GR) e a peroxirredoxina (Prxs) conseguem regular a proliferação celular e a apoptose através de interações diretas com moléculas efetoras, incluindo a proteína antioxidante I (AP-I), o fator indutor de hipoxia – 1α (HIF- 1α), o NF- κ B, o Nrf2 (fator nuclear derivado de eritroides 2) e o Keap1 (kelch – proteína I associada a ECH) (Chaiswing, St Clair e Clair, St., 2018).

O peróxido de hidrogénio citoplasmático leva à dissociação de complexos de fatores de transcrição e permite o transporte do NF- κ B e do Nrf2 através de poros nucleares até aos locais de ligação no DNA. Acredita-se que uma “redução ambiental” melhorada permite condições necessárias para otimizar a transferência de eletrões e a atividade enzimática, que são necessárias para os fatores de transcrição se ligarem ao DNA no núcleo (Moloney e Cotter, 2017; Sies, 2017; Kumari *et al.*, 2018).

O estado redox mitocondrial é, geralmente, regulado por: fosforilação oxidativa, taxa de consumo de glicose, pela superóxido dismutase dependente de manganésio (MnSOD) e pelos pares NADPH/NADP, Trx/TrxSS e GSH/GS-SG.

O par NADH/NAD da matriz mitocondrial atua a um potencial redox de -318 mV, que é o necessário para ocorrer a produção de ATP mitocondrial. Paralelamente, o sistema NADPH/NADP mitocondrial atua a -415 mV, funcionando assim a um potencial redox mais baixo que o sistema NADH/NAD. O par NADH/NAD é essencial para o catabolismo e para a produção de energia; regula no citoplasma a conversão de lactato a piruvato e na mitocôndria metabolitos do ciclo Krebs (isocitrato, hidroxibutirato, acetoacetato) (Jones e Sies, 2015).

As ROS mitocondriais, incluindo o peróxido de hidrogénio, são derivadas da respiração mitocondrial que depende do NADH. Existem evidências que indicam que os metabolitos, as APs, o HIF- 1α , as proteínas do ciclo de Krebs, as proteínas associadas à fosforilação oxidativa, os transdutores de sinais e os ativadores da transcrição 3 (STAT3) são regulados pelo estado redox mitocondrial (Antunes e Brito, 2017; Munro e Treberg, 2017).

A concentração fisiológica de H_2O_2 no citoplasma aparenta manter-se no intervalo $0.01 - 100$ μ M. Neste intervalo, o H_2O_2 regula a ativação redox de proteínas como a Prx e a Keap1. Mecanicamente, a oxidação de interruptores redox de proteínas altamente reativas, isto é, antioxidantes com grupos tiol, é necessária para transmitir informação através de uma rápida cascata de sinalização. Por exemplo, a Prx2 atua como um sensor, reage com o H_2O_2 e retransmite a oxidação originando a formação de ligações dissulfureto entre os monómeros STAT3. Estas evidências demonstram que o H_2O_2 em elevadas concentrações

atua como inibidor de APs e indutor de danos oxidativos. Nas células cancerígenas, os níveis celulares de H_2O_2 são maiores, o que sugere um estado pró-oxidante do estado redox citoplasmático (Jones e Sies, 2015; Antunes e Brito, 2017).

Em contraste com o estado redox intracelular, o par Cys/CySS é predominantemente expresso no plasma. O sangue e o espaço extracelular contêm grandes aglomerados redox dependentes de tiol, que envolvem Cys e CySS. Estas foram associadas a recetores e a proteínas extracelulares. O par Cys/CySS pode funcionar como um oxidante-redutor na mudança do estado redox, fornecendo um meio para oxidar-reduzir proteínas sem o envolvimento direto de oxidantes-redutores mais potentes. O potencial fisiológico redox do par Cys/CySS (E_h), em indivíduos saudáveis, é de cerca de -80 mV, enquanto que em indivíduos com fibrose pulmonar idiopática, o estado redox torna-se oxidado entre -65 e -20 mV. Vários estudos demonstraram que a modificação da relação Cys/CySS extracelular poderia regular diretamente ou estimular a expressão diferencial de genes que controlam atividades celulares, incluindo a proliferação e a invasão de células cancerígenas (Go *et al.*, 2010; Chaiswing, St Clair e Clair, St., 2018).

Além do par Cys/CySS, foram também detetadas no plasma tiorredoxinas, que estão localizadas na superfície celular e funcionam como dadoras de eletrões para a potencial atividade peroxidase da albumina. Apesar dos níveis elevados de expressão da TrxI, o peróxido de hidrogénio é outro regulador do estado redox que se encontra abundantemente presente no espaço extracelular (Schwertassek *et al.*, 2007).

Em resumo, cada tipo de células do corpo humano é capaz de alcançar as suas funções celulares únicas, através de um conjunto de proteínas, numa concentração específica e numa localização subcelular específica. O estado redox de cada compartimento subcelular é distinguido consoante os níveis do potencial redox, os tipos e níveis de proteínas antioxidantes e as concentrações dos pares tiol. O valor do potencial redox e os parâmetros do estado redox de cada compartimento subcelular conseguem ativar/desativar um conjunto de proteínas específicas, que contribuem para a distinção das consequências fisiológicas/patológicas, dando a vantagem seletiva para o *design* de terapêuticas a nível subcelular.

4. CÉLULAS NEOPLÁSICAS

As células neoplásicas utilizam preferencialmente e de forma mais eficiente a glicose (efeito Warburg) e apresentam também uma elevada capacidade antioxidante que regula as espécies reativas de oxigênio para níveis compatíveis com as funções biológicas celulares. Existem várias características de sobrevivência das células cancerígenas, como por exemplo, a habilidade em escapar ao sistema imunológico; a habilidade em lidar com a aneuploidia (diferente número de cromossomas); a habilidade em sofrer adaptações metabólicas, que fornecem um suplemento energético seguro às células cancerígenas e a formação de um mecanismo de defesa contra vários stresses celulares. Apesar dos níveis de ROS serem compatíveis com as funções biológicas celulares, estes são maiores nas células cancerígenas do que nas células normais. Quando o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes favorece para o lado dos oxidantes, ocorre stresse oxidativo, causando respostas adaptativas que resultam em mutações e instabilidade genómica (Gorrini, Harris e Mak, 2013; Moloney e Cotter, 2017; Kumari *et al.*, 2018).

O estado redox tem estado implicado em vários tratamentos anticancerígenos, como por exemplo, a radiação ionizante e a quimioterapia. A implicação da síntese das ROS nestas terapias tem por base o seu efeito no desencadeamento da apoptose, sendo assim consideradas também como supressores da proliferação celular. A radiação ionizante e a quimioterapia citotóxica são modalidades efetivas, se o seu uso não fosse limitado pelas preocupações com os danos nos tecidos saudáveis. É importante ter noção de que o estado redox das células cancerígenas pode ser heterogêneo, dependendo do tipo de cancro e do grau de agressividade. Desta forma, a indução adicional de stresse oxidativo por estes tratamentos pode causar ainda mais danos no DNA ou mutações que podem levar ao desenvolvimento de resistências nas células neoplásicas. O desequilíbrio redox demonstrou ser um fator que contribui para numerosos fenótipos de cancro, como por exemplo, o aumento da proliferação celular, a invasão e as mudanças epigenéticas que levam à progressão patológica. O estado redox sozinho não é suficiente para prever comportamentos celulares. É assim importante perceber como é que o estado redox muda ao longo da progressão da doença, como ativa ou regula diferentes proteínas durante a proliferação e a metástase e como é que responde ao metabolismo da célula ou ainda se é responsável pela resistência à terapêutica (Storr, Woolston e Martin, 2012; Kumari *et al.*, 2018).

O aumento do estado oxidativo no cancro pode estar relacionado ou com mutações nos genes supressores ou com a ativação de fatores de transcrição sensíveis ao estado

redox. O aumento dos níveis das ROS leva à ativação de vários fatores de transcrição, promove a formação de neoplasias ao induzir mutações no DNA e promove vias de sinalização pró-oncogénicas. Um exemplo destes efeitos é a mutação no K-ras, um gene que atua como um interruptor na sinalização celular. Quando funciona normalmente, a proteína k-ras controla a proliferação celular. No entanto, a sua mutação é regulada pelas espécies reativas de oxigénio e é frequentemente identificada em vários tipos de cancro, o que leva à contínua proliferação celular. Uma vez ativada, a forma mutante da proteína K-ras promove a translocação do p47^{phox}, componente da NOX1, para a membrana citoplasmática. Esta translocação vai promover a ativação da NOX1, que vai transferir eletrões do NADPH intracelular através da membrana, acoplando-os ao oxigénio molecular formando o anião superóxido (Park *et al.*, 2014; Murakami e Motohashi, 2015; Kumari *et al.*, 2018).

5. FATORES DE TRANSCRIÇÃO

O ciclo redox dos resíduos de cisteína (Cys) é um dos mecanismos importantes da atividade reguladora das ROS, dos fatores de transcrição e das moléculas sinalizadoras. Vários fatores de transcrição oncogénicos, sensíveis ao estado redox, contêm resíduos na região de ligação ao DNA, incluindo o NF-κB, o Nrf2, a AP-1 e a p53. A conformação é crítica para as interações proteína-DNA e DNA-DNA. Os resíduos de Cys dos fatores Nrf2, NF-κB e da AP-1, após a ativação e translocação para o núcleo, são reduzidos pela Trx1 e pelo fator redox-1 (REF1), de forma a ligarem-se ao DNA e a iniciar a ativação do gene (Haddad, 2002).

O fator de transcrição NF-κB é particularmente sensível às alterações redox celulares, em parte, devido à presença de múltiplos níveis de ativação. O NF-κB liga-se a várias regiões promotoras de genes que estão envolvidos na carcinogénese e na progressão de vários cancros. Os fatores nucleares κB são compostos por membros da família Rel que tem 5 membros: p50, p65 (RelA), p52, c-Rel e RelB. A ativação do NF-κB, nas células de mamíferos, pode ocorrer por duas vias maiores: a via clássica mediada pelo dímero p50:RelA; e a via alternativa mediada pelo dímero p52:RelB. O NF-κB está normalmente sequestrado no citoplasma como resultado da sua associação a proteínas inibidoras, tal como os membros da família IκB. IκB sustenta, sequencialmente, a dimerização de p50:RelA, através da ubiquitação e vias de degradação mediadas por proteossomas. O NF-κB é ainda sujeito à ativação por mecanismos que envolvem o processamento da p105 e p100 para libertar p50 e p52, respetivamente (Haddad, 2002).

A relação entre a progressão cancerígena e a ativação da família NF-κB estende-se a diversos tipos de cancro. Por exemplo, o NF-κB é ativado nas linhas celulares do cancro da próstata PC3 e DU145, que são independentes de androgénio. Por outro lado, nas linhas celulares LNCaP, que respondem ao androgénio, o NF-κB não é ativado. Isto sugere então que a exposição a androgénio ou ao recetor de androgénio regula a expressão do fator nuclear κB. Um estudo, em larga escala, sobre todos os elementos da família NF-κB demonstrou que estes são expressos em tecidos normais e em células cancerígenas. Com a exceção do cRel, cada elemento foi detetado também no núcleo das células cancerígenas. Foi correlacionada a localização nuclear de RelB com a escala de *Gleason* (escala que correlaciona o cancro da próstata à sua agressividade), o que sugere que o RelB pode ter um papel importante na resposta adaptativa ao stresse oxidativo no cancro da próstata. Apesar do objetivo dos estudos que inibem o NF-κB para melhorar a terapia anticancerígena seja o dímero p50/RelA, foi identificado que o dímero alternativo, p52:RelB, pode ser um potencial candidato para o direcionamento de cancros radiorresistentes (Haddad, 2002; Kikuchi *et al.*, 2003).

O Nrf2 é considerado o fator de transcrição “mestre” para as APs através da regulação de elementos de resposta antioxidante (ARE). Similarmente ao NF-κB, a atividade do Nrf2 é regulada por múltiplos passos. O Nrf2 liga-se normalmente à Keap1 no citoplasma, tornando-o inativo. Fatores adicionais envolvidos na inativação do Nrf2 são a degradação constitutiva da Keap1 associado às proteínas *Cullin-3* e *ring-box*. Estas proteínas formam o núcleo do complexo E3 ubiquitina ligase e estão envolvidas no processo de ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossoma 26S (Krajka-Kuźniak, Paluszczak e Baer-Dubowska, 2017; Kumari *et al.*, 2018).

Está demonstrado que as espécies reativas de oxigénio modificam os resíduos Cys específicos na Keap1, que resultam em:

- 1) libertação do Nrf2;
- 2) inibição da degradação constitutiva do Nrf2;
- 3) translocação, que facilita a ligação do Nrf2 ao ARE.

O complexo Nrf2/Keap1 é regulado por variações no potencial redox do par GSH/GS-SG, do par Trx/TrxSS e da concentração de H₂O₂ no citoplasma e no núcleo. Por sua vez, o Nrf2 ativa genes, conhecidos por desempenhar papéis na sobrevivência das células neoplásicas, como:

- proteínas antioxidantes; enzimas de síntese de GSH, TrxI, cisteína/transportador glutamato, Prxs, GSH-PxI, GSH-T;

- enzimas metabólicas; desidrogenase glucose-6-fosfato (G6PD), enzima malato I;
- transportadores de fármacos.

Adicionalmente, o Nrf2 leva ao aumento do nível de NADPH, cofator de enzimas que atuam na eliminação das ROS e das proteínas tióis oxidadas (Ray, Huang e Tsuji, 2012; Kumari *et al.*, 2018).

Um estudo de *Frohlich et al.* (2008) mostrou que no cancro da próstata o nível de regulação do Nrf2 é baixo e que a perda da sua função reduz a expressão e a atividade da glutathione transferase, o que promove a carcinogénese da próstata. Ou seja, o aumento do stresse oxidativo nas células neoplásicas pode, muitas vezes, resultar na diminuição da regulação do Nrf2. Por outro lado, vários estudos demonstraram que o Nrf2 pode ter um efeito oncogénico. Foi identificada a acumulação de Nrf2 devido a mutantes KEAP1 no cancro do pulmão, da cabeça e do pescoço e no carcinoma hepatocelular (Frohlich *et al.*, 2008; Chaiswing, St Clair e Clair, St., 2018).

O mecanismo pelo qual as células se protegem, de um xenobiótico que promove a formação de espécies reativas, está associado à ativação do Nrf2 e das APs. Por exemplo, as células com elevados níveis de Nrf2 são menos sensíveis à Doxorrubicina (antibiótico da família das antraciclinas usado na quimioterapia), a medicamentos à base de platina, ao Fluorouracil (5-FU) e à radiação. Paralelamente, a deficiência de Nrf2 em murganhos causa suscetibilidade ao stresse oxidativo e à exposição de agentes carcinogénicos. Estes estudos sugerem então que o Nrf2 pode ser considerado um potencial alvo terapêutico, assim como um inibidor da carcinogénese, tendo por base o estímulo, o ambiente, o estágio e o tipo de cancro (Moon e Giaccia, 2009; Ryoo, Lee e Kwak, 2016).

6. RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO

As principais características biológicas das neoplasias que influenciam os resultados dos tratamentos são as diferenças adquiridas quer intrínseca quer extrinsecamente como a capacidade de proliferação das células cancerígenas sobreviventes durante o intervalo dos tratamentos, a nutrição e o ambiente de stresse. Estes fatores podem contribuir para a variação do estado redox das células em cada fase. Numerosas células cancerígenas, nos estádios iniciais, têm níveis baixos de ROS, de APs e de tióis. Durante a progressão da doença e do tratamento, especialmente como resultado de terapias baseadas no estado redox, as células cancerígenas desenvolvem competências para sobreviver e manter a sua elevada capacidade proliferativa, através do reinício da sua homeostase, processando elevados níveis de ROS e APs, num processo denominado de “*rewired redox state*”. Trata-se

de uma resposta de proteção das células cancerígenas contra o stresse induzido pelo tratamento, levando assim à resistência ao tratamento e às metástases (Fulda e Debatin, 2006; Galadari *et al.*, 2017; Chaiswing, St Clair e Clair, St., 2018).

Um artigo de revisão de Mishra *et al.* (2016) revelou que o sistema sulfiredoxina-peroxirredoxina funciona como um sinalizador oncogénico em vários cancros, incluindo o da bexiga, sangue (leucemia), pulmão, colorretal, ovário e próstata. Os níveis de expressão de Prxs estão aumentados nas células neoplásicas e são passíveis de serem modificados pelas ROS. No geral, os dados que existem suportam a correlação entre “*rewired redox state*” e o estado mais oxidado em cancros de estágio mais avançado. Do ponto de vista clínico, níveis elevados e/ou tipos específicos de ROS podem revelar um conhecimento sobre vias de apoptose que podem ser usadas seletivamente para aumentar a apoptose, por aumento dos níveis das espécies reativas de oxigénio celulares. Um exemplo prático, é a expressão aumentada de BCL-2 na leucemia, que resulta num nível elevado de $O_2^{\cdot-}$ nas células e no bloqueio da ativação das caspases apoptóticas. Por outro lado, a diminuição do nível de $O_2^{\cdot-}$ aumenta a sensibilidade das células de leucemia ao Merocil, um agente anticancerígeno que induz a apoptose (Clément, Hirpara e Pervaiz, 2003; Chen e Pervaiz, 2010; Mishra *et al.*, 2015).

Estas descobertas sugerem que regulando os níveis das espécies reativas é possível direcionar as células cancerígenas para uma via responsável pela apoptose. As ROS atuam como moléculas sinalizadoras em diversos processos fisiológicos, sendo que aumentando os seus níveis no estado estável, além do limiar das células não transformadas, conseguem induzir efeitos *bystander*, incluindo fenótipos resistentes à quimioterapia e à radiação, induzindo danos nas células normais (Storr, Woolston e Martin, 2012; Galadari *et al.*, 2017).

7. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO COMO UMA TERAPIA ANTICANCERÍGENA

Devido às propriedades das espécies reativas de oxigénio no direcionamento do destino das células, tanto a terapia antioxidante como a pró-oxidante têm sido sugeridas como tratamentos anticancerígenos. Tendo por base as duas perspetivas, foram desenvolvidos ou estão em desenvolvimento inúmeros fármacos, agentes e abordagens, alguns dos quais se revelaram clinicamente promissores. No entanto, devido à complexidade do papel das ROS nas células normais e nas células cancerígenas, tanto as estratégias que diminuem o stresse oxidativo como as que o aumentam, mostraram várias vantagens e desvantagens. É ainda um enigma para investigadores e médicos perceber qual é a

predominante numa determinada situação e decidir qual a melhor estratégia a aplicar (Galadari *et al.*, 2017).

7.1. PORQUÊ UMA TERAPIA ANTICANCERÍGENA PRÓ-OXIDANTE?

As espécies reativas de oxigênio são responsáveis por desencadear a morte celular e reverter a quimiorresistência. Embora o tratamento de células neoplásicas indutoras destas espécies reativas com antioxidantes seja razoável, ironicamente, o tratamento com agentes quimioterápicos e com radiação ionizante não tem por base a morte de células cancerígenas associada ao aumento de antioxidantes, mas sim à produção de ROS, levando a stresse oxidativo irreversível. Têm-se vindo a demonstrar evidências de que várias terapêuticas anticancerígenas dependem destas espécies reativas e que com o aumento adicional dos seus níveis celulares consegue-se induzir a morte de mais células neoplásicas (Wang e Yi, 2008).

Tanto a apoptose mediada por recetores de morte como pela mitocôndria depende muito das ROS. A apoptose mediada pela mitocôndria é caracterizada por uma abertura dos poros de permeabilidade transitória (PT), que resulta na libertação do citocromo c, na formação do apoptossoma e culmina na ativação de caspases. As ROS têm impacto na estabilidade dos poros de PT, tanto através da cascata de sinalização celular, como através da modificação oxidativa de componentes do complexo de permeabilidade transitória (Galadari *et al.*, 2017).

A cinase JN, também denominada por proteína cinase ativada por stresse, é uma molécula importante de sinalização, mediadora da abertura dos poros de PT induzida pelas ROS. As espécies reativas ativam a cascata de sinalização através dos seguintes mecanismos:

- 1) Indução da dimerização e da ativação da ASK1;
- 2) Libertação da MEKK1 ou da ASK1 das moléculas inibidoras como a Trx e a GSH-T;
- 3) Inibição da atividade da proteína tirosina fosfatase (PTP) para ativar a Src e iniciar a cascata seguinte.

Após a ativação pelas espécies reativas de oxigênio, a JNK pode translocar para a membrana da mitocôndria, de forma a ativar as proteínas desestabilizadoras dos poros (Bax/Bak), ou inibir as proteínas estabilizadoras dos poros (Bcl-2 e Bcl-xl), resultando na abertura dos poros de PT (Galadari *et al.*, 2017).

Por outro lado, a autofagia, processo pelo qual as células eucarióticas são degradadas e os organelos e as macromoléculas são reciclados, tem um papel importante na resposta celular ao stresse oxidativo. Vários estudos demonstraram que a autofagia é ativada e regulada pelas ROS. Os resultados da autofagia podem variar desde a remoção de

patogêneos, organelos e proteínas danificados, que promove a sobrevivência celular, até à morte celular programada. As ROS podem então atuar como moléculas sinalizadoras tanto da morte celular autofágica, como da autofagia propensa à sobrevivência. As ROS, como mediadoras da morte celular autofágica das células neoplásicas, já estão postas em prática. A eficácia e a seletividade desta terapia são indicadas para alguns tipos de células cancerígenas, incluindo as células derivadas de gliomas malignos que são resistentes a várias terapias pró-ópticas, como a radioterapia e a quimioterapia convencional (Galadari *et al.*, 2017).

O tratamento com fármacos de platina (cisplatina/carboplatina) ativa aductos de DNA que induzem danos no ácido desoxirribonucleico. São observados vários mecanismos de resistência nas células neoplásicas resistentes ao tratamento com platina. Um dos mecanismos de resistência é a formação de conjugados platina-GSH, especialmente nas células que mantêm um elevado nível de GSH. Os agentes pró-oxidantes como o MnP (um mimético da SOD mitocondrial) podem induzir vários efeitos:

- formação de ROS mitocondriais. O efluxo das ROS inibe a função mitocondrial e ativa a apoptose;
- formação de ROS celulares. A indução do stresse oxidativo celular utiliza a GSH e previne as conjugações desta com a platina;
- conjugação MnP-GSH. O MnP liga-se direta ou indiretamente à GSH, evita as conjugações com o fármaco de platina, permitindo ao fármaco atuar.

A terapia combinada com compostos pró-oxidantes como a MnP, reduziria então a resistência das células a estes tratamentos.

Além disto, a introdução da NOX1 nas células cancerígenas da próstata pode diminuir, significativamente, a expressão do HIF-1 α e do transportador de resistência a múltiplos fármacos (MDR), a glicoproteína-P (P-gp). Da mesma forma, a adição de Emodina, agente que leva à produção de ROS, pode inibir a atividade transcripcional do HIF-1 α e diminuir a regulação da glicoproteína-P, resultando num aumento da retenção da Doxorubicina, que é um agente citotóxico usado na prática clínica. Estes dados demonstram uma relação negativa entre as ROS e a quimiorresistência observada nesta patologia (Wartenberg *et al.*, 2005; Wang e Yi, 2008; Daga *et al.*, 2016).

7.2. VÁRIAS TERAPIAS PRÓ-OXIDANTES ANTICANCERÍGENAS

O estudo do potencial efeito das ROS na morte das células cancerígenas pode ser feito de duas formas:

- 1) indução da síntese de ROS diretamente nas células cancerígenas;
- 2) inibição das enzimas antioxidantes (sistema de defesa).

As concentrações efetivas finais das ROS nas células neoplásicas são fundamentais para a terapia pró-oxidante. Estas concentrações dependem não só do aumento da quantidade de indutores, mas também da quantidade de ROS e da capacidade antioxidante das células cancerígenas. A mitocôndria é a fonte mais importante de síntese de superóxido. Muitos agentes anticancerígenos foram usados para perturbar a cadeia de transporte de elétrons (ETC), levando ao aumento da perda de elétrons da cadeia e, conseqüentemente, a uma produção elevada de ROS. Os componentes da ETC, como o complexo I e II, foram descritos como alvos diretos de alguns agentes que aumentam os níveis de ROS (Munro e Treberg, 2017).

Nos doentes com leucemia linfocítica crônica, os teores basais de superóxido nas células estão positivamente relacionados com a sua sensibilidade ao Metoxiestradiol (ME-2). Foi também descoberto que os níveis das ROS determinam a sensibilidade de várias células de leucemia ao Trioneto de Arsénio. O Trioneto de Arsénio é um composto capaz de estimular a produção das espécies reativas e o ME-2 é um inibidor da superóxido dismutase. A junção destes dois compostos vai aumentar a atividade citotóxica do Trioneto de Arsénio e diminuir a resistência ao Metoxiestradiol. Desta forma, com o desenvolvimento da avaliação precisa das espécies reativas nas células de leucemia no sangue periférico, a sensibilidade destes doentes à terapia oxidante pode ser prevista. Para doentes que têm baixo nível de ROS nas células neoplásicas, pode ser necessário doses mais altas de agentes. No entanto, alguns cancros em fase avançada, que desenvolveram um melhor sistema anti-oxidante para se adaptar ao aumento do stresse oxidativo, podem apresentar um baixo nível de ROS e elevada quimiorresistência. Para estes casos, os agentes que atacam o sistema anti-oxidante celular podem exercer efeitos mais eficientes (Zhou *et al.*, 2003; Chaiswing, St Clair e Clair, St., 2018).

7.2.1. INDUÇÃO DA SÍNTESE DE ROS DIRETAMENTE NAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Desde 1950, muitas estratégias terapêuticas têm sido pensadas com base nesta ideia, como a administração de espécies reativas de oxigénio ou de enzimas produtoras destas espécies em linhas celulares cancerígenas ou em murinos portadores de cancro. Como o peróxido de hidrogénio é clinicamente prejudicial à saúde humana, fizeram-se grandes esforços para encontrar agentes ou tratamentos que conseguissem converter-se em espécies reativas de oxigénio ou que conseguissem estimular a síntese endógena destas espécies nas células cancerígenas. Estes produtores de ROS são usados, isoladamente, como fármacos anticancerígenos ou em combinação com a quimioterapia convencional ou a radioterapia (Wang e Yi, 2008; Sies, 2017).

O primeiro agente descoberto que induz a síntese de ROS e que foi usado como um fármaco anticancerígeno foi a Procarbazina. Este fármaco é rapidamente oxidado ao derivado azo, levando à formação de espécies reativas. Foi aprovado na década de sessenta (1960) como um citotóxico e, desde então, tem sido utilizado no tratamento do linfoma de *Hodgkin*, do linfoma *não-Hodgkin* e, como atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica, é usado também nos cancros cerebrais primários (Glasauer e Chandel, 2014).

Vários compostos de Arsénio podem tratar a leucemia promielocítica aguda (APL) e outras leucemias, que são dependentes das espécies reativas. O Imexon, composto com atividade anticancerígena em estudo, induz a apoptose com o aumento do stresse oxidativo celular. A atividade anticancerígena e a segurança do Imexon foram confirmadas em vários tipos de cancro, em estudos pré-clínicos e em estudos de fase I/II. O Trióxido de Arsénio (ATO) tem eficácia no tratamento de doentes com APL e exerce também o seu efeito de indutor de apoptose através da produção de ROS. Foi observado que a NADPH oxidase é a principal fonte das ROS induzidas pelo ATO (Glasauer e Chandel, 2014; Galadari *et al.*, 2017).

Os fármacos biológicos também podem induzir apoptose através da síntese de ROS. O Rituximabe, que é um anticorpo monoclonal anti-CD20, aprovado para o tratamento do linfoma *não-Hodgkin*, induz uma rápida e intensa produção de ROS nas células (Glasauer e Chandel, 2014).

7.2.2. INIBIÇÃO DOS SISTEMAS DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS (DEFESA)

Para além de aumentar a produção de ROS, a interferência nos sistemas antioxidantes celulares também leva ao aumento dos níveis das ROS, o que leva à apoptose das células cancerígenas. Entre os antioxidantes, a superóxido dismutase, o sistema tioredoxina e o sistema glutatona surgiram como alvos importantes para o desenvolvimento de fármacos anticancerígenos (Wang e Yi, 2008).

Como já foi referido anteriormente, o stresse oxidativo está ligado à resistência das células aos fármacos. Muitas vezes, a capacidade de um fármaco induzir a apoptose das células neoplásicas depende da capacidade destas para gerar ROS. Por outro lado, níveis baixos de ROS favorecem a expressão de transportadores, como a P-gp, responsáveis pela quimiorresistência. As células cancerígenas resistentes aos fármacos apresentam, normalmente, níveis baixos de ROS. Esta característica é devida, geralmente, aos elevados níveis de GSH intracelular e ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a GSH-Px, a CAT e a SOD. A GSH é também necessária para as reações de desintoxicação de fase II; por exemplo, a glutatona S-transferase (GSH-T) precisa de GSH para a conjugação de fármacos e xenobióticos eletrofílicos. Por isso, as células resistentes apresentam níveis elevados de GSH e GSH-T, sendo necessário então, a diminuição da glutatona celular, de forma a restaurar a sensibilidade da célula ao efeito citotóxico dos fármacos (Mookerjee et al., 2006; Corso e Acco, 2018).

Desta forma, foram desenvolvidos diferentes agentes farmacológicos com o objetivo de diminuir a GSH intracelular, de forma a combater a resistência a fármacos. O Isotiocianato de feniletilo (PEITC), que é um composto natural, não só elimina a GSH celular, como também inibe a enzima GSH-Px, de forma a desativar o sistema antioxidante GSH, levando à acumulação exagerada de ROS nas células neoplásicas. A Butionina sulfoximina (BSO) inibe a enzima limitante da síntese de GSH e tem sido testada na sensibilização de várias células cancerígenas a vários fármacos, incluindo compostos de platina e de arsénio e alquilantes. Os níveis baixos de GSH nas células de Leucemia Promielocítica Aguda determinam a sua sensibilidade à apoptose induzida por Trióxido de Arsénio e a BSO consegue atuar de forma sinérgica com o ATO na indução da apoptose. Vários estudos pré-clínicos demonstraram que a depleção de GSH com BSO resulta num aumento da citotoxicidade da Cisplatina e de agentes alquilantes *in vivo* (Wang e Yi, 2008; Corso e Acco, 2018).

O sistema Tiorredoxina, que é composto por Trx, NADPH e tiorredoxina redutase (TrxR), é visto cada vez mais como um alvo para o desenvolvimento de novas terapias anticancerígenas, devido a várias razões:

- à expressão aumentada de Trx e TrxR presente em várias neoplasias, que pode estar associada ao crescimento agressivo do cancro, à baixa probabilidade de sobrevivência e à resistência à quimioterapia;
- ao facto da tiorredoxina ser, normalmente, responsável por manter o estado reduzido da adenina-nucleotídeo-translocase (ANT) de forma a impedir a abertura dos poros de PT;
- e devido ao facto da diminuição de TrxR I reverter a morfologia e as propriedades de crescimento das células cancerígenas do pulmão de murganhos (LLCI).

Além disso, quando as células LLCI são injetadas em murganhos, a progressão do cancro e as metástases são drasticamente reduzidas. Vários inibidores do sistema Trx/TrxR foram avaliados em modelos experimentais de cancro, como por exemplo, o *Motexafin gadolinium*, que consegue induzir a morte, especificamente, das células cancerígenas, no entanto não foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (Glasauer e Chandel, 2014; Jones e Sies, 2015).

A produção de superóxido e a baixa atividade da superóxido dismutase nas células cancerígenas podem tornar estas células altamente dependentes da SOD para sobreviver e sensíveis à inibição desta. Tornar a SOD um alvo terapêutico, pode ser uma abordagem muito promissora para a morte seletiva das células cancerígenas. O Metoxiestradiol é um novo fármaco anticancerígeno, que demonstrou ser capaz de inibir a SOD e induzir a apoptose de células de leucemia, através de um mecanismo mediado pelas ROS. A inibição da Cu,Zn-SOD por agentes quelantes de cobre, como o Dissulfiram e o ATN224, também demonstrou atividade clínica quer *in vitro*, quer *in vivo* (Glasauer e Chandel, 2014; Chaiswing, St Clair e Clair, St., 2018).

7.3. TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) baseia-se no uso da luz e de fotossensibilizadores (PS) e está aprovada para vários tipos de cancro. O tratamento é feito através da irradiação do tumor com um comprimento de onda específico, após a administração de fotossensibilizadores específicos (PS). Esta terapia permite reduzir os efeitos secundários sistémicos que os fármacos anticancerígenos convencionais podem causar (Park, 2018).

Atualmente a TFD tem-se mostrado eficaz contra câncros precoces. Esta terapia tem sido utilizada frequentemente no tratamento do câncer da mama, intraocular, cerebral e pancreático. Esta utiliza dois componentes não tóxicos, os PS e a luz de comprimento de onda específico, para induzir a morte de células cancerígenas, através da indução de espécies reativas de oxigênio. Os PS ativados pela luz transferem a sua energia para moléculas de oxigênio, induzindo assim a formação de ROS. O ânion superóxido é considerado a espécie reativa de oxigênio mais importante para o resultado terapêutico e tanto o aumento da atividade da xantina oxidase (XOD) como a foto-oxidação de alguns constituintes celulares, contribuem para a formação das ROS durante a TFD (Park, 2018).

7.4. TERAPIA COMBINADA DE AGENTE PRODUTOR DE ROS E FÁRMACOS OU TERAPIAS ANTICÂNCERÍGENAS

Foi demonstrado que os agentes produtores das ROS podem facilitar os efeitos terapêuticos dos tratamentos anticancerígenos tradicionais. Foi demonstrado, por exemplo, que a Emodina, que é uma antraquinona com efeito anticancerígeno, pode, através do aumento dos níveis de ROS, aumentar a citotoxicidade de vários quimioterápicos dependentes destas espécies, de forma sinérgica, incluindo o Trióxido de Arsênio, a Doxorubicina e o Taxol, em vários tipos de células cancerígenas e em murinhos transplantados usados como modelo experimental cancerígeno. Os mecanismos subjacentes envolvem a regulação dupla das ROS na sinalização pró e anti-apoptose, na qual a libertação do citocromo c e a ativação de caspases são promovidas, enquanto a AP-1, o NFκB e o HIF-1α são suprimidos. Esta abordagem exerce pouco impacto nas células normais *in vitro* e não provoca efeitos tóxicos sistêmicos *in vivo*, em murinhos (Wang e Yi, 2008; Tong *et al.*, 2015).

8. BENEFÍCIO/RISCO DE TERAPIAS DE REGULAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As ROS estão presentes em todas as células de mamíferos, independentemente de estas serem cancerígenas ou não. Estas espécies reativas são necessárias tanto para as células cancerígenas, como para as células normais e, da mesma forma, estas são tóxicas tanto para umas como para as outras. Na sequência desta ideia, a possibilidade de induzir a morte das células cancerígenas de forma eficaz e com elevada seletividade, surgiu como uma das maiores preocupações no uso de abordagens de regulação das ROS (Wang e Yi, 2008).

8.1. SELETIVIDADE DAS TERAPIAS

Um conceito para terapia anticancerígena, proposto anteriormente, descreve que, juntamente com o aumento das ROS, as respostas celulares são de proliferação adaptativa para o equilíbrio e, após estas espécies ultrapassarem um certo nível, para a apoptose. Nas células normais, a eliminação de radicais livres através do uso de antioxidantes é uma forma eficaz de proteger as células das modificações induzidas pelas espécies reativas de oxigénio e dos efeitos colaterais das terapias antineoplásicas. Nas células cancerígenas, os antioxidantes ou os baixos níveis das ROS que induzem a produção de antioxidantes, demonstram ser benéficos para a proliferação das células e para aumentar a resistência destas às terapias anticancerígenas. Isto demonstrou existir uma suscetibilidade diferencial entre as células cancerígenas e as normais para as estratégias de aumento ou de depleção das espécies reativas de oxigénio. Por exemplo, aumentar a produção destas espécies reativas e/ou diminuir a capacidade antioxidante células cancerígenas, pode ser desejável para estas (Galadari *et al.*, 2017).

Com base em dados que demonstram que os níveis celulares basais das ROS afetam ou podem até mesmo determinar a sensibilidade das células ao tratamento que leva ao aumento destas espécies e, conseqüentemente, à morte celular e com base no facto de que a estratégia de aumento das ROS tem pouco impacto sobre as células normais, foi sugerida uma teoria alternativa. Quando as células cancerígenas e as normais são expostas a uma intensidade igual de produtores ou estimuladores de ROS exógenas, o nível intracelular destas espécies é mais fácil de atingir um limiar que desencadeie a morte celular, nas células cancerígenas. Esta diferença deve-se ao maior nível basal de ROS existente nas células cancerígenas, ou ao seu sistema antioxidante ineficaz. (Figura 4) Isto explica a seletividade relativa das abordagens pró-oxidantes que foram estudadas por vários grupos de investigação (Wang e Yi, 2008).

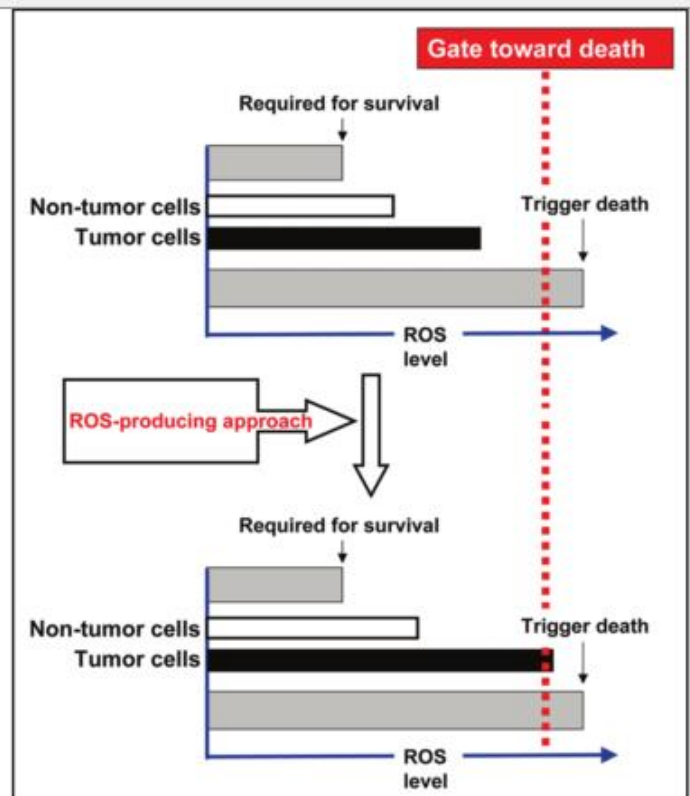


Figura 4. Diferente suscetibilidade das células neoplásicas e das células normais à terapia de produção de ROS. Normalmente, as células normais apresentam níveis de ROS inferiores aos níveis encontrados nas células neoplásicas. Quando as células são submetidas a um tratamento que aumenta a quantidade de espécies reativas de oxigênio, o nível destas nas células neoplásicas ultrapassa mais rapidamente o limiar para o desencadeamento da apoptose do que o nível nas células normais. Esta diferença de suscetibilidades permite então uma terapia anticancerígena que leve à produção de ROS. Imagem retirada de, Wang e Yi, 2008.

8.2. EFICÁCIA: AUMENTAR OU DIMINUIR O NÍVEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO?

De acordo com a literatura, as duas abordagens, de aumento e de depleção das espécies reativas de oxigênio, mostram-se eficazes e os fármacos baseados em ambas as teorias também se mostraram eficazes não só em estudos *in vivo* em animais, mas também em ensaios pré-clínicos (Galadari *et al.*, 2017).

Para escolher qual a melhor abordagem para um determinado grupo de células, é importante perceber se a apoptose destas é favorecida pelo aumento das espécies reativas ou, pelo contrário, pela diminuição. Esta diferença está assente na extensão dos níveis das espécies reativas, que determina o papel destas para pró-cancerígeno ou para anticancerígeno. Sabe-se que o aumento modesto das ROS é cancerígeno, enquanto que o aumento acentuado destas atua como supressor de cancro. As células com altos níveis são então mais suscetíveis à apoptose induzida por estas espécies, sendo estas células adequadas

para a terapêutica que aumenta ainda mais os níveis de ROS. Em contrapartida, as células com um aumento modesto de ROS são as mais adequadas para a abordagem de depleção (Galadari *et al.*, 2017).

A adequação da escolha da terapia pode ser avaliada pela capacidade de resposta ao stresse oxidativo gerado pelas terapias ou pelos fármacos. É necessário ver se as vias de sinalização celular que desempenham um papel pró-cancerígeno são reforçadas ou se são bloqueadas por uma determinada intensidade de estímulos. Os principais fatores de transcrição, como o NF- κ B, a AP-1 e o HIF, nas células neoplásicas, estão sujeitos à ativação, atuando no sentido da sobrevivência e de anti-apoptose. Estes fatores são estimulados por vários fármacos. Como são todos sensíveis ao estado redox, estes são ativados como resposta ao stresse oxidativo leve, mas são inativados pelo stresse oxidativo muito elevado. Para um determinado tipo de cultura de células cancerígenas, antes de iniciar o tratamento com agentes indutores da síntese das ROS, é necessário examinar primeiro o papel de um ou de todos estes fatores de transcrição, em relação a terem uma função pró-cancerígena ou anticancerígena. Se, por exemplo, o NF- κ B desempenha um papel anti-apoptótico e a sua ativação for suprimida em vez de aumentada pelo tratamento com os fármacos indutores de ROS, a terapia de aumento das espécies reativas pode ser adequada neste tipo de células cancerígenas. Por outro lado, se o tratamento com estes fármacos torna o NF- κ B mais ativo, o que leva a um aumento pequeno do nível de ROS, muito abaixo do limiar de apoptose, a terapia não é adequada (Wang e Yi, 2008; Galadari *et al.*, 2017).

A capacidade de resposta celular ao stresse oxidativo é também refletida por outras proteínas, sendo a p53 uma das mais importantes. A p53 também é um fator de transcrição sensível ao estado redox e atua na reparação do DNA, no bloqueio do crescimento celular e na apoptose como resposta ao stresse oxidativo. Células com danos oxidativos no DNA, mas que não ativam a p53, são células, aparentemente, adequadas para indução da apoptose por uma terapia que aumente os níveis das ROS. A diminuição das espécies reativas nestas células, pode ajudar na sua sobrevivência (Schieber e Chandel, 2014).

É então fundamental desenvolver um conjunto de parâmetros indicativos, entre os quais o estado de ativação de vários fatores de transcrição sensíveis ao estado redox, antes de iniciar o tratamento, de forma a perceber qual a terapia de regulação das ROS que deve ser usada num determinado tipo de célula.

Como o nível das espécies reativas de oxigénio é heterogéneo, mesmo dentro de um determinado tipo de células cancerígenas, a chamada “estratégia de duas fases” pode ser uma alternativa eficaz. Esta estratégia preconiza, sequencialmente, as abordagens de manipulação opostas, para matar as células cancerígenas de forma mais efetiva. Como o

Ascorbato pode reagir de forma espontânea com o oxigénio molecular e formar peróxido de hidrogénio, é usada uma elevada dose de Ascorbato intravenoso na primeira fase, de forma a aumentar a síntese das ROS. Este deve ser seletivamente tóxico para as células cancerígenas com baixa atividade catalase. Numa segunda fase, durante os intervalos entre as sessões de terapia com Ascorbato, são administrados agentes que podem inibir, com segurança, a NADPH oxidase, de forma a inibir a síntese das espécies reativas e a retardar a proliferação e a disseminação das células neoplásicas sobreviventes. De acordo com esta terapia, muitos estimulantes oxidantes e inibidores oxidantes poderiam funcionar de forma cooperativa no tratamento da doença. No entanto, são necessárias mais pesquisas pré-clínicas para verificar a viabilidade desta estratégia de duas fases (McCarty, Barroso-Aranda e Contreras, 2007).

8.3. CÉLULAS NEOPLÁSICAS OXIDADAS E TECIDOS NORMAIS REDUZIDOS: INTERFERÊNCIA DISCRIMINATIVA COM AS ROS?

A sensibilidade das células cancerígenas transplantadas em murganhos à quimioterapia está associada de forma oposta à sua capacidade antioxidante total. As células com menor capacidade antioxidante (maior capacidade oxidativa) crescem mais lentamente do que aquelas que apresentam maior capacidade antioxidante (maior capacidade redutora). As células neoplásicas tratadas com uma terapia que aumenta a quantidade de ROS e que apresentam proliferação mais reduzida, têm, geralmente, um potencial antioxidante total mais fraco. No entanto, não são observadas alterações na capacidade antioxidante total do soro periférico e dos eritrócitos, nos indivíduos correspondentes. Isto indica que a Emodina, produtora de ROS, juntamente com os fármacos quimioterapêuticos de rotina, que aumentam drasticamente os níveis das espécies reativas de oxigénio nas células, não altera então o equilíbrio redox sistémico. Este efeito faz supor que, para a terapia de aumento das ROS, a eficácia ótima e a menor toxicidade sistémica podem ser antecipadas num indivíduo com cancro altamente oxidativo e, simultaneamente, com tecidos normais pouco oxidativos (Yang *et al.*, 2004; Poprac *et al.*, 2017).

Alguns investigadores preocupam-se com o facto de que a terapia de aumento das ROS nos doentes possa colocar células normais em risco de dano oxidativo ou de carcinogénese. Como o tratamento é um evento relativamente transitório, acredita-se que esta terapia não aumentará este risco mais do que as terapias convencionais. No entanto, alguns órgãos, como o coração, o rim e o fígado, podem, de facto, ser vulneráveis à toxicidade oxidativa. Nesta base, uma manipulação discriminativa das espécies reativas pode

ser mais benéfica nos casos em que estas são aumentadas localmente nas células neoplásicas, mas diminuem no sangue periférico ou são mantidos para o equilíbrio redox sistémico.

Kong et al. (1998) conduziram experiências delicadas, nas quais a estratégia de aumento das ROS no tratamento de cancros cerebrais é aplicada por meio de uma técnica local de administração de fármacos, enquanto que os antioxidantes são administrados sistemicamente. Esta combinação de abordagens de manipulação discriminativas, demonstrou ser um benefício terapêutico significativo em murganhos com cancros cerebrais. Infelizmente, não existem muitos tecidos semelhantes ao cérebro que possam formar um ambiente relativamente isolado da circulação sanguínea (*Kong, Lillehei e Kleinschmidt-Demasters, 1998; Wang e Yi, 2008*).

8.4. CUIDADOS NA DETEÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO

Para estabelecer o papel das ROS no desenvolvimento da doença, bem como no tratamento, é essencial conseguir medi-las com precisão. Devido à diferença na metodologia para detetá-las, alguns agentes foram contraditoriamente considerados como oxidantes ou como antioxidantes. Um exemplo é a Emodina, que foi considerada como agente antioxidante até ao momento, independentemente, de ter sido demonstrado que esta induz a síntese de grande quantidade de espécies reativas para induzir a morte das células cancerígenas. Com o Ácido Ascórbico, a situação é semelhante. A medição das ROS celulares deve ser feita imediatamente após a adição de agentes específicos, porque as células atingem rapidamente um novo balanço redox após a sua adaptação, durante a qual, a produção de antioxidantes pode ser excessivamente ativada. O atraso na medição pode levar a uma conclusão oposta sobre o papel redox do agente. Além disto, a avaliação do estado redox dos fluídos corporais pode ser bastante útil na previsão da eficácia, assim como dos efeitos colaterais. No entanto, apesar de ser simples a deteção do nível de peróxido de hidrogénio nos fluídos corporais, como a urina humana, os dados atualmente disponíveis são insuficientes para apoiar o uso de H_2O_2 na urina como um biomarcador do stresse oxidativo. Ao usar um método de deteção, é importante pensar cuidadosamente sobre como este funciona, o que pode interferir com ele e de que forma este pode ser quantitativo (*Yang et al., 2004; Wang e Yi, 2008; Antunes e Brito, 2017*).

9. O PAPEL DO FARMACÊUTICO NO ACOMPANHAMENTO DE DOENTES ONCOLÓGICOS

O papel do farmacêutico tem-se vindo a tornar cada vez mais amplo, conseguindo este ser um parceiro importante nos cuidados de saúde e relevante para a promoção de uma saúde de proximidade. Este agente de saúde pública tem um contacto próximo com o doente, conseguindo atuar na educação e na promoção da saúde da população.

No acompanhamento de doentes com cancro, o farmacêutico pode ter vários papéis importantes e que vão ter um grande impacto na qualidade de vida do doente.

É muito importante que o farmacêutico, ao saber da situação clínica do doente, atue de forma a garantir a adesão à terapêutica. O farmacêutico, como especialista do medicamento, tem a obrigação de esclarecer todas as dúvidas ao doente e de o alertar para possíveis efeitos secundários e para a duração da terapia. A adesão à terapêutica é fundamental, sobretudo, nos casos em que esta é feita em casa e não no hospital. É crucial que o doente perceba a importância de seguir à risca tudo o que foi prescrito pelo médico.

Um papel que o farmacêutico deve ter nestes casos é o de alertar o doente para a automedicação. Deve alerta-lo para os possíveis efeitos que a automedicação pode ter no seu caso e que nunca deve fazê-lo sem pedir opinião de um médico e/ou farmacêutico. É de extrema importância alerta-lo para os produtos publicitados com antioxidantes. O farmacêutico deve conseguir explicar-lhe que apesar de nas publicidades estes produtos serem muito enaltecidos e existir uma panóplia deles, na sua situação podem ser muito prejudiciais. Deve conseguir explicar por palavras simples que não deve de todo consumir qualquer tipo de antioxidante sem primeiro falar com o seu médico e/ou farmacêutico. É muito importante ter um conhecimento aprofundado do estado de saúde do doente e saber que terapia está a fazer, de forma a perceber se o uso de antioxidantes é benéfico ou não, assim como alertar o doente para não consumir qualquer tipo de planta sem pedir opinião médica primeiro e que deve referir sempre todas as plantas que consumiu. As plantas nestes doentes podem ser perigosas. Por um lado, podem alterar a farmacocinética da terapia que está a fazer e, por outro lado, pode levar à alteração do estado redox das células do doente e interagir assim com o tratamento.

10. CONCLUSÃO

As espécies reativas de oxigênio são radicais livres produzidos pelos organismos aeróbios durante o metabolismo normal das células. Estas espécies desempenham diversas funções nos processos fisiológicos, como por exemplo, ativam a resposta ao stresse oxidativo e atuam como moléculas sinalizadoras da proliferação celular. Em contrapartida, quando os seus níveis aumentam, estas são vistas como prejudiciais para a saúde humana. Quando os níveis são elevados, as ROS conseguem causar vários danos, como por exemplo, provocar lesões degenerativas nas células, danificar os lípidos, as proteínas e o DNA e acelerar o envelhecimento. As ROS podem ainda induzir a carcinogénese através de mutações no DNA e nas vias de sinalização pró-oncogénicas.

Apesar de as espécies reativas de oxigênio serem vistas como prejudiciais para as células, estas conseguem desempenhar funções importantes nas células cancerígenas, podendo ser usadas no tratamento anticancerígeno. Apesar dos níveis das espécies reativas de oxigênio serem maiores nas células cancerígenas do que nas normais, acredita-se que com terapias de manipulação destas espécies, ao aumentar ainda mais os níveis, se consiga induzir a apoptose destas células, não atingindo as células normais. Sabe-se que o aumento modesto das ROS é cancerígeno, enquanto que o aumento acentuado destas atua como supressor cancerígeno. No entanto, existe ainda muita controvérsia ao redor destes tratamentos. Devido à complexidade do papel das ROS nas células normais e nas células cancerígenas, tanto as estratégias que aumentam o stresse oxidativo como as que o diminuem, mostram vantagens e desvantagem. Apesar de prejudiciais, também podem ser benéficas, contudo, é necessário que os estudos continuem de forma a conseguir-se perceber de forma clara quais são as vantagens e as desvantagens destas terapias e quais são as características celulares que devem predominar para aplicar esta terapia.

Esta nova abordagem das espécies reativas de oxigênio é vista como uma possibilidade de tratamento anticancerígeno, no entanto ainda são precisos muitos estudos para que estes tratamentos cheguem à prática clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, F.; Brito, P. M. – Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. *Redox Biology* **13** (2017) 1-7.
- Bilan, D.S.; Shokhina, A. G.; Lykhanov, S. A.; Belousov V. V. – Main Cellular Redox Couples. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **41** (2015) 341-356.
- Chaiswing, L.; Clair, W. H.; Clair, D. K. – Redox Paradox: A novel approach to therapeutics-resistant cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*. (2018) Published Online: 21 Feb 2018, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7485>.
- Chen, Z. X.; Pervaiz, S. – Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death and Differentiation* **17** (2010) 408-420.
- Clément, M. V.; Hirpara, J. L.; Pervaiz, S. – Decrease in intracellular superoxide sensitizes Bcl-2-overexpressing tumor cells to receptor and drug-induced apoptosis independent of the mitochondria. *Cell Death and Differentiation* **10** (2003) 1273-1285.
- Corso, C. R.; Acco, A. – Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **128** (2018) 43-57.
- Daga, M.; Ullio, C.; Argenziano, M; Dianzani, C.; Cavalli, R.; Trotta, F.; Ferretti, C.; Zara, G. P.; Gigliotti, C. L.; Ciamporcerro, E. S.; Pettazzoni, P.; Corti, D.; Pizzimenti, S. – GSH-targeted nanosponges increase doxorubicin-induced toxicity “in vitro” and “in vivo” in cancer cells with high antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine* **97** (2016) 24-37.
- Ferreira, I. C. F. R.; Abreu, R. M. V. – Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise* **2** (2007) 32-39.
- Frohlich, D. A.; Cabe, M. T., Arnold, R. S.; Day, M. L. – The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis. *Oncogene* **27** (2008) 4353-4362.
- Fulda, S.; Debatin, K. M. – Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25** (2006) 4798-4811.
- Galadari, S.; Rahman, A.; Pallichankandy, S.; Thayyullathil, F. – Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine* **104** (2017) 144-164.

- Glasauer, A.; Chandel, N. S. – Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* **92** (2014) 90-101.
- Go, Y. M.; Park, H.; Koval, M.; Orr, M.; Reed, M.; Liang, Y.; Smith, D.; Pohl, J.; Jones, D. P. – A key role for mitochondria in endothelial signaling by plasma cysteine/cystine redox potential. *Free Radical Biology and Medicine* **48** (2010) 275-283.
- Gorrini, C.; Harris, I. S.; Mak, T. K. – Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery* **12** (2013) 931-947.
- Haddad, J. J. – Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling* **14** (2002) 879-897.
- Jones, D. P.; Sies, H. – The Redox Code. *Antioxidants & Redox Signaling* **23** (2015) 734-746.
- Kikuchi, E.; Horiguchi, Y.; Nakashima, J.; Kuroda, K.; Oya, M.; Ohigashi, T.; Takahashi, N.; Shima, Y.; Umezawa, K.; Murai, M. – Suppression of Hormone-refractory Prostate Cancer by a Novel Nuclear Factor κ B Inhibitor in Nude Mice. *Cancer Research* **63** (2003) 107-110.
- Kong, Q.; Lillehei, K.; Kleinschmidt, B. – Intralesionally implanted cisplatin plus systemic carmustine for the treatment of brain tumor in rats. *Journal of Surgical Oncology* **69** (1998) 76-82.
- Krajka-kuzniak, V.; Jaroslaw, P.; Dubowska, W. B. – The Nrf2-ARE signaling pathway: An update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacological Reports* **69** (2017) 393-402.
- Kumari, S.; Badana, A. K.; Mohan, M.; Malla, R. – Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker Insights* **13** (2018) 1-9.
- McCarty, M. F.; Aranda, J. B.; Contreras, F. – A two-phase strategy for treatment of oxidant-dependent cancers. *Medical Hypotheses* **69** (2007) 489-496.
- Miranda, N – Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. In, A Saúde dos Portugueses 2016. *Direção-Geral da Saúde* (2016) 95-107. [Acedido a 08 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-serie.aspx>
- Miranda, N.; Gonçalves, M. B.; Andrade, C.; Santos, G. – Programa nacional para as doenças oncológicas 2017. *Direção-Geral da Saúde* (2017) 1-24. [Acedido a 08 de abril de 2018].

Disponível na Internet: <https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-serie.aspx>

Mishra, M.; Jiang, H.; Wu, L.; Chawsheen, H. A.; Wei, Q. – The Sulfiredoxin-Peroxiredoxin (Srx-Prx) Axis in Cell Signal Transduction and Cancer Development. *Cancer Lett* **366** (2015) 150-159.

Moloney, J. N.; Cotter, T. G. – ROS signaling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (2017) 1-15.

Mookerjee, A.; Base, J. M.; Majumder, S.; Chatterjee, S.; Panda, G. S.; Dutta, P.; Pal, S.; Mukherjee, P.; Efferth, T.; Roy, S.; Choudhuri, S. K. – A novel copper complex induces ROS generation in doxorubicin resistant Ehrlich ascites carcinoma cells and increases activity of antioxidant enzymes in vital organs in vivo. *BMC Cancer* **6** (2006) 1-11.

Moon, E. J.; Giaccia, A. – The dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: possible implications in cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine* **6** (2009) 247-253.

Munro, D.; Treberg, J. R. – A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species. *The Journal of Experimental Biology* **220** (2017) 1170-1180.

Murakami, S.; Motohashi, H. – Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. *Free Radical Biology and Medicine* **88** (2015) 168-178.

Park, M. T.; Kim, M. J.; Suh, Y.; Kim, R. K.; Kim, H.; Lim, E. J.; Yoo, K. C.; Lee, G. H.; Kim, Y. H.; Hwang, S. G.; Yi, J. M.; Lee, S. J. – Novel signaling axis for ROS generation during K-Ras-induced cellular transformation. *Cell Death & Differentiation* **21** (2014) 1185-1197.

Park, W.; Cho, S.; Han, J.; Shin, H.; Na, K.; Lee, B.; Kim, D. H. – Advanced smart-photosensitizers for more effective cancer treatment. *Biomaterials Science* **6** (2018) 79-90.

Poprac, P.; Jomova, K.; Simunkova, M.; Kollar, V.; Rhodes, C. J.; Valko, M. – Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* **38** (2017) 592-607.

Ray, P. D.; Huang, B. W.; Tsuji, Y. – Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* **24** (2012) 981-990.

Redza. M. D.; Bates, D. A. A. – Activation of apoptosis signaling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* **1863** (2977-2992).

- Ryoo, I.; Lee, S.; Kwak, M. K. – Redox Modulating NRF2: A Potential Mediator of Cancer Stem Cell Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016** (2016) 1-14.
- Schieber, M.; Chandel, N. S. – Oxidative ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* **24** (2014) 453-462.
- Schwertassek, U.; Balmer, Y.; Gutscher, M.; Weingarten, L.; Preuss, M.; Engelhard, J.; Winkler, M.; Dick, T. P. – Selective redox regulation of cytokine receptor signaling by extracellular thioredoxin-I. *The Embo Journal* **26** (2007) 3086-3097.
- Sies, H. – Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative stress. *Redox Biology* **11** (2017) 613-619.
- Storr, S. J.; Woolston, C. M.; Martin, S. G. – Base excision repair, the redox environment and therapeutic implications. *Current Molecular Pharmacology* **5** (2012) 88-101.
- Tong, L.; Chuang, C. C.; Wu, S.; Zuo, L. – Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letters* **367** (2015) 18-25.
- Wang, J.; Yi, J. – Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology and Therapy* **7** (2008) 1875-1884.
- Wartenberg, M.; Hoffmann, E.; Schwindt, H.; Grunheck, F.; Petros J.; Arnold, J. R. S.; Sauer, H. – Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. *FEBS Letters* **579** (2005) 4541-4549.
- Yang, J.; Li, H.; Chen, Y. Y.; Wang, X. J.; Shi, G. Y.; Hu, Q. S.; Kang, X. L.; Lu, Y.; Tang, X. M.; Guo, Q. S.; Yi, J. – Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity in vitro and in vivo via reactive oxygen species-mediated dual regulation of apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **37** (2004) 2027-2041.
- Zhou, Y.; Hileman, E. O.; Plunkett, W.; Keating, M. J.; Huang, P. – Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *American Society of Hematology* **101** (2003) 4098-4104.