



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Beatriz Santos Azevedo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Desregulação de pH - Um aliado importante na evolução do cancro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Manuela Cardoso, da Dra. Maria do Carmo Marques e da Professora Doutora Ana Cabral apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Beatriz Santos Azevedo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Desregulação de pH - Um aliado importante na evolução do cancro" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação, da Dra. Manuela Cardoso, da Dra. Maria do Carmo Marques e da Professora Doutora Ana Cabral apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Eu, Beatriz Santos Azevedo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014211874, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Desregulação de pH - Um aliado importante na evolução do cancro” 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, 2 de setembro de 2019



(Beatriz Santos Azevedo)

## **Agradecimentos**

Após cinco anos de luta e de muitas conquistas, chega a hora de agradecer àqueles que estiveram a meu lado e acompanharam o meu percurso. Não será possível dirigir-me a todos, pelo que referencio os que mais fortemente contribuíram para o meu sucesso.

Aos meus pais, a quem não tenho palavras para agradecer todos os sacrifícios feitos e todo o amor revelado ao longo destes cinco anos. Nada teria sido possível sem o vosso amor, apoio e compreensão.

Ao meu irmão, por estar sempre presente e me apoiar em tudo o que estava ao seu alcance.

À minha querida Avó, a minha segunda mãe, por todo o apoio e pelo orgulho que sempre revelou ao longo de todo o meu percurso, pessoal e académico.

À minha tia Manuela, que infelizmente partiu antes da conclusão da minha formação, mas sei que me continuou a acompanhar e hoje olha por mim. Imagino o seu sorriso e o olhar de orgulho. Consegui tia!

À minha família, que desde sempre me apoiou e acompanhou em todos os momentos mais importantes da minha vida, demonstrando sempre confiança em mim. Um agradecimento especial à minha afilhada, que apesar da tenra idade, sempre revelou um enorme orgulho e vontade de acompanhar o percurso da madrinha.

Às minhas colegas de casa, Gisela Martins e Rosa Fernandes, pelo companheirismo e por todos os bons momentos vividos. Não foi Coimbra que nos apresentou, mas foi ela que nos juntou. Tenho certeza que continuaremos os nossos caminhos lado a lado.

Às amigas que Coimbra me deu, que levarei comigo para a vida.

A toda a equipa da Farmácia Arcozelo, em especial à Dra. Manuela Cardoso, e à equipa da Garantia de Qualidade do Grupo Tecnimede, em especial à Dra. Maria do Carmo Marques, por toda a disponibilidade, apoio e partilha de conhecimentos, que contribuiu para a minha integração nas equipas e para uma experiência de estágio muito enriquecedora.

À Professora Doutora Ana Cabral, por toda a dedicação, conselhos e sugestões de melhoria dadas ao longo da realização da monografia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por me permitir adquirir conhecimentos que são a minha base para o futuro, quer a nível profissional, quer pessoal.

A Coimbra.

# Índice

## Parte I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>1- Introdução</b> .....	<b>8</b>
<b>2- Análise SWOT</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1 - Pontos Fortes</b> .....	<b>9</b>
2.1.1 - Equipa técnica.....	9
2.1.2 - Única estagiária .....	9
2.1.3 - Diversidade de tarefas .....	9
2.1.4 - Sistema informático Sifarma 2000®.....	10
2.1.5 - Conhecimentos MICF .....	10
<b>2.2 - Pontes Fracos</b> .....	<b>11</b>
2.2.1 - Vasta variedade de produtos no mercado e nomes comerciais .....	11
2.2.2 - Preparação de manipulados .....	11
2.2.3 - Acesso a formações muito limitado .....	11
2.2.4 - Novo Módulo de Atendimento ao Utente do Sifarma.....	12
<b>2.3 - Oportunidades</b> .....	<b>12</b>
2.3.1 - Serviços diferenciados prestados.....	12
2.3.2 - Falta de conhecimentos científicos dos utentes .....	13
<b>2.4 - Ameaças</b> .....	<b>13</b>
2.4.1 - Falta temporária de certos medicamentos no mercado .....	13
2.4.2 - Mudança de embalagem da medicação .....	13
2.4.3 - Solicitação de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) .....	14
2.4.4 - Venda de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) fora das farmácias .....	14
2.4.5 - Legibilidade das receitas manuais.....	15
<b>3- Conclusão</b> .....	<b>16</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>17</b>

## Parte II: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>19</b>
<b>1- Introdução</b> .....	<b>20</b>
<b>2- Análise SWOT</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 - Pontos Fortes</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 - Grupo sólido em território nacional e internacional .....	21
2.1.2 - Grande ligação da Garantia da Qualidade a outras departamentos.....	21
2.1.3 - Ligação muito estreita com a produção .....	22
2.1.4 - Visita à Atlantic Pharma (AP).....	22
2.1.5 - Diversidade de tarefas realizadas.....	22
2.1.6 - Trabalho coordenado entre várias equipas .....	23
2.1.7 - Instalação de novos equipamentos .....	23

<b>2.2 - Pontos Fracos</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 - Tempo de estágio curto.....	23
2.2.2 - Impossibilidade de acompanhar auditorias externas .....	24
<b>2.3 - Oportunidades</b> .....	<b>24</b>
2.3.1 - Aproximação facilitada à realidade profissional.....	24
2.3.2 - Possibilidade de integrar a “Academia de Talentos” .....	25
<b>2.4 - Ameaças</b> .....	<b>25</b>
2.4.1 - Outro estagiário.....	25
2.4.2 - Dificil acesso à carreira em Indústria Farmacêutica .....	25
<b>3- Conclusão</b> .....	<b>26</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>27</b>
 <b>Parte III: Desregulação de pH - Um aliado importante na evolução do cancro</b>	
<b>Resumo</b> .....	<b>29</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>30</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>31</b>
<b>1- Introdução</b> .....	<b>33</b>
<b>2- Reprogramação metabólica das células cancerígenas</b> .....	<b>35</b>
2.1- Efeito de Warburg .....	36
2.2- Fator induzido por hipóxia I (HIF-1).....	38
2.3 - Efeito de Warburg e o metabolismo oxidativo (OxyPhos) .....	39
2.4- pH e regulação do metabolismo.....	40
2.5- Trocador de Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> (NHE1) .....	41
<b>3- Características do microambiente tumoral (TME)</b> .....	<b>42</b>
<b>4- Influência do pH na formação de metástases</b> .....	<b>44</b>
<b>5- Forma como o pH influencia respostas do sistema imunitário</b> .....	<b>48</b>
5.1 - Células Natural Killers (NK) .....	49
5.2 - Células dendríticas (DCs) .....	51
5.3 - Células T .....	52
5.4 - Células T reguladoras (Tregs) .....	54
5.5 - Células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs).....	55
<b>6- Implicações do pH desregulado no tratamento do cancro</b> .....	<b>56</b>
<b>7- Conclusão</b> .....	<b>60</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>61</b>

# Parte I

## Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



## **Lista de Abreviaturas**

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MNSRM** - Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

**MSRM** - Medicamento Sujeito a Receita Médica

**SWOT** - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

## I - Introdução

O farmacêutico é um agente de saúde e o exercício da sua atividade tem como objetivo essencial a pessoa do doente. A sua primeira e principal responsabilidade é para com a saúde e o bem-estar do doente e do cidadão em geral, devendo estar sempre presente o elevado grau de responsabilidade que a profissão exige. Desta forma, é responsável por transmitir a informação referente ao medicamento, promovendo o seu uso racional e a adesão à terapêutica, contribuindo para um tratamento eficaz, seguro e com qualidade.<sup>(1)</sup>

O Mestrado Integrado em Ciência Farmacêuticas (MICF) consiste numa formação multidisciplinar que incorpora um estágio curricular, no qual temos, obrigatoriamente, que exercer a nossa atividade em Farmácia Comunitária. É nesta fase que os estudantes têm oportunidade de aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do seu percurso académico, neste caso em contexto profissional, ao mesmo tempo que adquirem novas competências, essenciais para o exercício da atividade.

Pela facilidade de acessos às farmácias e pelo reconhecimento dos serviços prestados, estas são, muitas vezes, o local onde os utentes recorrem, numa primeira instância, com objetivo de resolver algumas questões ligadas à saúde. Mas pode também ser o último contacto destes com os serviços de saúde. Por esse motivo, é essencial que o farmacêutico tenha os seus conhecimentos sempre atualizados, bem como adquira constantemente novas competências de forma a satisfazer as necessidades do utente e da sociedade.

Para a realização do meu estágio curricular, a fim de concluir o meu ciclo de estudos, escolhi a Farmácia Arcozelo, em Barcelos, sob orientação da Dra. Manuela Cardoso, Diretora Técnica da farmácia em causa.

A estrutura do presente relatório, referente ao estágio realizado em Farmácia Comunitária, baseia-se numa análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), na qual apresento as forças e fraquezas, oportunidades e ameaças que observei e/ou senti no decorrer desta etapa.

## **2- Análise SWOT**

### **2.1 - Pontos Fortes**

#### **2.1.1 - Equipa técnica**

Desde o primeiro dia a equipa da Farmácia Arcozelo demonstrou grande disponibilidade para me ajudar em tudo aquilo que fosse necessário, tornando-se assim o meu pilar durante todo o meu percurso na farmácia. Inicialmente deram-me uma breve explicação para que eu percebesse os princípios nos quais assentava o funcionamento da farmácia, deixando-me desde logo à vontade para esclarecer, junto de qualquer um dos profissionais, todas as dúvidas que me surgissem no exercício da atividade. Comecei o estágio com o papel de observar tudo aquilo que se passava em meu redor, sendo-me dadas novas tarefas e responsabilidades à medida que o tempo avançava, permitindo-me ser cada vez mais autónoma na execução das atividades.

No meu ponto de vista, aquilo que diferencia uma farmácia não são os produtos que esta disponibiliza aos utentes, mas sim a qualidade do serviço e aconselhamento prestados, ou seja, está dependente dos seus profissionais. Pelo facto de não ter experiência na área e sentir medo de falhar perante o utente, a passagem para o balcão desde sempre me deixou ansiosa, pelo que foi feita por fases. Comecei por estar presente nos atendimentos apenas para observação, depois foi-me concedida a responsabilidade de recolher os medicamentos solicitados pelo utente. Desta forma, fui-me sentindo mais confiante e, sem dar conta, já me encontrava a fazer atendimento ao público de uma forma muito tranquila e independente. Também o facto de ter sempre um profissional disponível para intervir no atendimento, caso necessário, fez com que não me sentisse constantemente sob pressão e/ou nervosa.

#### **2.1.2 - Única estagiária**

Aliada ao facto de a equipa técnica ter sido excelente comigo, ser a única estagiária na altura foi um ponto a meu favor, uma vez que tinha concentrada em mim toda a atenção e ajuda da equipa. A partir do momento que entrei na farmácia tornei-me parte integrante da equipa e foi depositada em mim uma grande confiança, pelo que me esforcei por corresponder a todas as expectativas.

#### **2.1.3 - Diversidade de tarefas**

Durante o estágio foi-me dada a oportunidade de executar várias tarefas, todas elas importantes para ter uma perceção global do funcionamento de uma farmácia. Como tarefas *BackOffice*, efetuei a receção e gestão de encomendas, o que me permitiu ter uma visão geral no que diz respeito à parte da gestão. Aliada a esta tarefa, estava o arrumo dos produtos no

seu respetivo local, o que fez com que me familiarizasse com a sua localização, algo que se tornou útil na fase do atendimento. Também nesta fase, consegui ter uma pequena noção de *marketing* e *merchandising* farmacêutico. Na fase do atendimento foi sem dúvida a altura onde me surgiram mais dúvidas, mas também aquela em que mais aprendi, pois consegui interligar e aplicar os conhecimentos que adquiri ao longo da formação académica. A nível do aconselhamento ao doente, fui sentindo enormes melhorias, tanto na informação transmitida, como na segurança com que era feito. Foi a parte mais desafiante deste percurso, mas também a mais gratificante, por saber que estava, através dos meus conselhos, a ajudar alguém que recorreu a um profissional numa situação de necessidade, ou apenas para esclarecer alguma dúvida que pairasse na sua cabeça. Aprendi que além de profissionais, muitas vezes somos o ombro amigo daqueles que nos procuram.

#### **2.1.4 - Sistema informático Sifarma 2000®**

O sistema informático Sifarma 2000® foi desenvolvido pela Glintt, por e para farmacêuticos, e é utilizado por 90% das Farmácias em Portugal.<sup>(2)</sup>

Sem dúvida alguma que o Sifarma 2000® é um enorme aliado no exercício da atividade farmacêutica. Para além de se revelar imprescindível na parte de gestão da farmácia (no que diz respeito a gestão de *stocks*, perceção da média de vendas, encomendas instantâneas e diárias diretamente e em tempo útil a armazenistas, controlo de prazos de validade, proceder a reclamações e devoluções, entre outros) é também uma ferramenta essencial durante o atendimento, uma vez que tem ao nosso dispor uma alargada base de dados científica que pode ser muito útil para que seja prestado um melhor aconselhamento, ou mesmo para que sejam esclarecidas algumas dúvidas pontuais que surjam, nomeadamente: posologia, indicações terapêuticas e contraindicações. Outra grande vantagem, se não a maior, é que a forma como está concebido faz com que seja muito diminuta a possibilidade de errar durante um atendimento com receita eletrónica, o que numa primeira fase, em que estamos a iniciar o atendimento ao público e o erro é mais propenso, se revelou crucial.

#### **2.1.5 - Conhecimentos MICF**

O plano de formação de MICF integra um vasto leque de disciplinas que permitem aos seus estudantes adquirir uma panóplia de conhecimentos em diversas áreas, assim como uma visão alargada daquilo que é a atividade farmacêutica. A forte componente teórica, por um lado permitiu que conhecêssemos as patologias existentes e seus possíveis tratamentos, bem como os aspetos técnicos dos medicamentos e/ou produtos existentes. Só é possível prestar um bom serviço farmacêutico, quando temos as bases necessárias para isso e as conseguimos por em prática.

## **2.2 - Pontes Fracos**

### **2.2.1 - Vasta variedade de produtos no mercado e nomes comerciais**

No início do estágio senti-me um pouco perdida num mundo constituído por milhares de produtos que estão disponíveis para venda/aconselhamento no mercado farmacêutico, e com os quais ainda não tinha tido qualquer contacto, pelo que não eram por mim conhecidos. Para fazermos um bom aconselhamento, temos que ter noção dos produtos que existem e quais os que melhor se adequam a cada situação. Uma outra dificuldade foi associar os nomes comerciais às substâncias ativas e vice-versa. Inicialmente era muito auxiliada pelo Sifarma 2000® para obter a informação que precisava. No entanto, são conhecimentos que facilmente se vão adquirindo com a experiência, e após alguns dias consecutivos na farmácia comecei a familiarizar-me com os produtos. A partir deste ponto, tudo se tornou mais fácil, começando a despedir-me de alguns medos e inseguranças.

### **2.2.2 - Preparação de manipulados**

Na Farmácia Arcozelo era muito raro haver preparação de manipulados. Entenda-se por medicamento manipulado “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”.<sup>(3)</sup> A menos que fosse um procedimento de preparação muito simples e que necessitasse de pouco material e tempo, os manipulados eram reencaminhados para outra farmácia para a sua elaboração. Diariamente, o contacto com o laboratório reduzia-se apenas à reconstituição de medicamentos extemporâneos.

### **2.2.3 - Acesso a formações muito limitado**

A Farmácia Arcozelo situa-se no concelho de Barcelos pelo que o acesso a formações era muito diminuto. A maioria das formações mais próximas realizava-se no Porto, pelo que teria que me deslocar, o que se tornava muito dispendioso para um estudante estagiário. Para além disso, o número de vagas era muito pequeno dada a afluência de pessoas. Tentei inscrever-me em algumas formações que já não tinham vagas disponíveis. No geral, na zona Norte existem muito menos oportunidades para este tipo de eventos do que na zona centro, o que se torna um fator limitante para os profissionais que residem nestes meios. Considero este facto um ponto fraco porque nessas formações, além de nos serem apresentados os produtos existentes/novos/em voga no mercado, fazem-no com muito pormenor e são dadas dicas de como fazer o aconselhamento usando esses mesmos produtos, ou até mesmo estratégias de venda desses produtos em conjunto com outros que lhe sejam complementares (*cross selling*). São sem dúvida uma boa oportunidade de alargar os nossos conhecimentos.

Principalmente na dermocosmética, uma área em constante evolução, são lançados novos produtos a todo o momento, pelo que é necessário estar constantemente atualizado.

#### **2.2.4 - Novo Módulo de Atendimento ao Utente do Sifarma**

Durante o meu estágio, e na farmácia onde este foi realizado, era-me permitido utilizar o Sifarma 2000® ou o sistema mais recente, o Módulo de Atendimento ao Utente. Por um lado, foi muito bom porque uma vez que o antigo Sifarma vai ser substituído pelo mais recente, a tendência é cada vez mais farmácias o utilizarem, pelo que é benéfico saber trabalhar neste. Apesar de apresentar inúmeras vantagens, ainda apresenta algumas falhas pelo que por vezes dificultou o meu trabalho. Para além disso, ainda só tem disponível o Módulo de Atendimento ao Utente, pelo que todas as restantes operações eram realizadas no mais antigo, tendo obrigatoriamente que utilizar os dois sistemas. Assim sendo, apesar do sistema novo ser mais intuitivo e atual, optei por utilizar apenas o Sifarma 2000® antigo, ao qual rapidamente me adaptei.

### **2.3 - Oportunidades**

#### **2.3.1 - Serviços diferenciados prestados**

Como espaço de saúde, a farmácia onde o estágio foi realizado prestava uma série serviços farmacêuticos diferenciados à comunidade, alguns dos quais tive oportunidade de participar. Entre outras atividades, diariamente faziam-se medições de glicémia, colesterol, triglicéridos e tensão arterial, assim como administração de injetáveis e vacinas e execução de primeiros socorros. Não estava habilitada a administrar injetáveis e vacinas, nem a fazer primeiros socorros, no entanto, desde sempre me foi permitido acompanhar os membros da equipa que executavam estas tarefas, para que pudesse ganhar alguns conhecimentos nesta área através da observação das técnicas utilizadas e das questões levantadas e respetivas respostas. Pude, no entanto, fazer a medição dos parâmetros de risco cardiovascular e interpretar os seus valores, explicando aos utentes cada um deles e os seus riscos associados. Apercebi-me que uma grande parte da população ainda não percebeu o impacto que valores alterados nestes parâmetros têm a longo prazo. Cabe-nos a nós, profissionais de saúde, informar e sensibilizar os utentes para hábitos e estilos de vida saudáveis e reforçar a adoção de medidas não farmacológicas para uma melhor qualidade de vida, atual e futura. Para permitir uma melhor monitorização destes parâmetros, eram entregues aos utentes cartões onde constavam os valores das medições efetuadas.

### **2.3.2 - Falta de conhecimentos científicos dos utentes**

A Farmácia Arcozelo está inserida numa comunidade maioritariamente envelhecida, a qual na sua generalidade tinha poucos conhecimentos na área da saúde. Por outro lado, os poucos conhecimentos que possuíam muitas vezes estavam errados. Foi aqui uma enorme oportunidade de aplicar os meus conhecimentos e perceber a importância que um farmacêutico tem na comunidade que o envolve. Assim sendo, em cada atendimento esforcei-me por explicar tudo aquilo que o utente precisava saber acerca do medicamento que lhe fora prescrito/indicado, desde a sua função aos seus efeitos adversos. Em muitos atendimentos, graças à atenção prestada individualmente a cada utente, apercebi-me de utentes que estavam a tomar medicação crónica, ou não, de forma errada. Uma grande dificuldade da maioria passava pela utilização correta dos dispositivos médicos. Assim, era essencial em cada dispensa explicar de forma pormenorizada como se devia utilizar, e repetir a explicação caso persistisse qualquer dúvida. Só desta forma, com acompanhamento personalizado e individualizado, conseguimos um uso racional e seguro do medicamento, bem como a adesão à terapêutica.

## **2.4 - Ameaças**

### **2.4.1 - Falta temporária de certos medicamentos no mercado**

Na altura da realização do meu estágio, de janeiro a abril de 2019, houve um grande número de medicamentos em falta no mercado. Alguns estiveram esgotados por curtos períodos, outros durante meses, o que se tornou bastante problemático. Muitos utentes pensavam que era por culpa da farmácia, outros mesmo sabendo que a culpa não nos era imputável, revoltavam-se com os profissionais responsáveis pelo seu atendimento. É certo que muitos dos esgotados tinham substitutos, mas outros não. Em alguns casos foi necessário o utente marcar consulta com o seu médico para pedir uma nova medicação que substituísse a que estava em falta, o que nem sempre era fácil por se tratar de medicação que era tomada de forma crónica ao longo de anos, sendo difícil encontrar outra que fosse surtir o mesmo efeito. Tudo isto fazia com que houvessem atrasos nos atendimentos e, por vezes, períodos em que os utentes não tinham a medicação adequada para tomar. Todos os dias era necessário entrar em contacto com fornecedores na tentativa de repor stocks, mas a maioria das vezes essa tentativa não era bem sucedida porque nem eles possuíam os produtos.

### **2.4.2 - Alteração de embalagens**

Aliada à medicação temporariamente esgotada, estava a constante mudança de embalagens. Muitos utentes eram polimedicados e não alfabetizados, pelo que tomavam a medicação mediante as caixas, cores e forma do medicamento. Bastava haver alguma troca num destes três fatores para que a toma da medicação de forma correta se tornasse

complicado para eles. Assim sendo, uma pequena mudança de embalagem, ou mesmo na forma dos blisters e/ou comprimidos não era bem aceite por este grupo de pessoas. No entanto, a única coisa que podíamos fazer era, para além de convencer a pessoa de que se tratava do mesmo produto apenas com uma embalagem diferente, arranjar estratégias para que não houvesse qualquer troca de medicação na hora da toma.

### **2.4.3 - Solicitação de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM)**

Um evento recorrente no dia-a-dia de uma farmácia é a solicitação de MSRM, sem a respetiva receita. A maioria das vezes tratava-se de medicação crónica, outras vezes tratavam-se de pessoas que faziam o seu próprio diagnóstico e queriam uma medicação específica, como o caso concreto de pessoas que me pediram antibiótico para a dor de garganta. Há farmácias que dispensam este tipo de medicação sem receita, pelo que o utente espera que o farmacêutico que o está a aconselhar/atender também o faça. Na sociedade temos pessoas com várias personalidades, pelo que algumas entendem a nossa posição em não atender aos seus pedidos, outras, baseados no facto de conseguirem adquirir estes produtos sem a respetiva receita noutras farmácias, não entendem. Este facto era motivo de “conflito” entre o profissional e o utente, tornando-se uma ameaça no exercício da sua atividade.

### **2.4.4 - Venda de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) fora das farmácias**

De acordo com o Decreto-Lei n.º 134/2005, o governo considerou que os medicamentos para uso humano, concretamente os que não necessitam de receita médica, podem ser comercializados fora das farmácias, dados os benefícios proporcionados aos consumidores por esse alargamento, quer em termos de acessibilidade facultada pelo aumento do número de pontos de venda quer em termos de preço.<sup>(4)</sup>

Esta nova medida, permitiu que a população tenha mais acesso a MNSRM, ao mesmo tempo que contribui para a redução do preços dos mesmos, dado o regime de preço livre de venda fixado, onde apenas estão regulamentadas as margens máximas de comercialização.<sup>(4)</sup> Por este motivo, de forma indireta, na minha opinião, estamos a contribuir para o uso inadequado e irracional do medicamento, o que pode colocar em causa a saúde pública, uma vez que muitas vezes falta um aconselhamento adequado por parte do profissional que efetua a venda. É essencial o papel de um profissional especializado para tentar travar este efeito, dado que se verifica um aumento no número de vendas nestes locais.

No que me diz respeito, acho que este fator é uma ameaça, uma vez que muitas pessoas, movidas pelo menor preço e não pelo melhor serviço, escolhem estes locais para a compra

de produtos. Assim sendo, perdi algumas oportunidades de aconselhar o utente, principalmente na área da dermocosmética.

#### **2.4.5 - Legibilidade das receitas manuais**

Hoje em dia, a quase totalidade das receitas que chegam à farmácia são eletrónicas. No entanto, há uma pequena quantidade que ainda é passada de forma manual pelo prescritor, apenas permitida em situações excecionais: a) Falência informática; b) Inadaptação do prescritor; c) Prescrição no domicílio, d) Até 40 receitas/mês. Considero que estas constituíram uma ameaça ao trabalho por mim desempenhado, pelo facto de em alguns casos ser difícil perceber os medicamentos prescritos, dada a ilegibilidade da letra do prescritor. Para decifrar o conteúdo da receita, ou apenas para minimizar os erros que poderiam surgir, pedia sempre auxílio a um colega para a interpretar. Uma forma de confirmar se a nossa leitura estava correta, era conversar com o doente e perguntar qual o motivo que o levou até ao médico. Era mais uma via para evitar erros. Todos estes elementos contribuía para um atendimento mais demorado, o que não era do agrado da maioria dos utentes.

### **3- Conclusão**

A realização deste Estágio Curricular em Farmácia Comunitária deu-me a oportunidade de aplicar e consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo dos últimos cinco anos, enquanto estudante de MICF, ao mesmo tempo que me permitiu adquirir competências essenciais para a prática da atividade farmacêutica. O MICF é um curso muito completo, que nos transmite a informação base essencial, no entanto, a prática e experiência em contexto real revelou-se essencial para a melhoria das minhas capacidades, profissionais e pessoais. Isto porque nos deparamos diariamente com casos concretos reais, todos eles muito diferentes e desafiantes. Com estes, para além do desenvolvimento de conhecimentos técnicos e científicos, considero que aumentei as minhas capacidades pessoais e sociais, que são essenciais para prestar um bom atendimento e aconselhamento. Às vezes, aos olhos dos utentes, não somos apenas profissionais, mas também um ombro amigo. Perceber os problemas de cada um e cuidar também é uma forma de prestar serviço.

Concluída esta etapa, considero que evoluí enquanto profissional de saúde e enquanto pessoa. Caso o futuro me reserve uma carreira em Farmácia Comunitária, sinto-me preparada para assumir essa responsabilidade, exercendo as minhas funções com inteira autonomia técnica e científica, tendo sempre como objetivo essencial a pessoa do doente.

## Referências Bibliográficas

- (1) ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. [Acedido a 10 de maio de 2019]. Disponível em: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo\\_deontologico\\_da\\_of\\_4436676175988472c14020.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf)
- (2) GLINTT - **SIFARMA – Desenvolvido por e para Farmacêuticos. 90% das Farmácias em Portugal usam o SIFARMA**. [Acedido a 15 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
- (3) MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Portaria n.º594/2004. Diário da República, 1ª Série-B, N.º 129 de 2 de junho de 2004**. [Acedido a 17 de maio de 2019]. Disponível em: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/261875/details/maximized>
- (4) DIÁRIO DA REPÚBLICA ELETRÓNICO - **Decreto-Lei n.º 134/2005**. Diário da República, 1ª Série-A, N.º156 de 16 de agosto de 2005. [Acedido a 30 de maio de 2019]. Disponível em: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/243692/details/maximized>

## **Parte II**

### **Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**



## **Lista de Abreviaturas**

**AP** - Atlantic Pharma

**CM** - Controlo Microbiológico

**CQ** - Controlo de Qualidade

**GQ** - Garantia de Qualidade

**GT** - Grupo Tecnimede

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**SWOT** - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

## I- Introdução

O ciclo de estudos de MICF tem uma forte componente ligada à Indústria Farmacêutica, de forma a que após a conclusão dos estudos, os estudantes estejam preparados para abraçar oportunidades de trabalho nesta área.

A Faculdade de Farmácia dá a oportunidade aos seus estudantes de realizarem um estágio complementar ao de Farmácia Comunitária no ramo da Indústria Farmacêutica, o que acho uma ótima oportunidade de alargar os nossos conhecimentos, ganhando experiência na área. Sendo a única Faculdade de Farmácia que o permite, acho que os estudantes formados em Coimbra na área de Ciências Farmacêuticas se encontram em vantagem perante os restantes, no que toca a oportunidades futuras a nível profissional.

A Indústria Farmacêutica é responsável por produzir medicamentos e por todos os passos necessários à sua produção e introdução no mercado, nomeadamente investigação, desenvolvimento e comercialização. Nas várias fases de produção do medicamento, o papel do farmacêutico, como profissional de saúde especialista do medicamento, é imprescindível.

O estágio foi realizado no Grupo Tecnimede, em Sintra, no departamento de Garantia de Qualidade, sob a orientação da Dra. Maria do Carmo Marques.

A estrutura do presente relatório, referente ao estágio realizado em Indústria Farmacêutica, baseia-se numa análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), na qual apresento as forças e fraquezas, oportunidades e ameaças que observei e/ou senti no decorrer desta etapa.

## **2- Análise SWOT**

### **2.1 - Pontos Fortes**

#### **2.1.1 - Grupo sólido em território nacional e internacional**

O Grupo Tecnimede (GT) tem um sólido posicionamento em território nacional e presença direta em Espanha, Itália, Marrocos, Colômbia e Brasil. A sua missão é comprometer-se com a melhoria e preservação da vida humana e da saúde através do desenvolvimento, produção e comercialização de produtos farmacêuticos, com um forte enfoque na qualidade e inovação tecnológica. Iniciou a sua atividade em 1980 e abrange todo o ciclo de vida do medicamento para uso humano - desenvolvimento, produção, promoção e comercialização.<sup>(1)(2)</sup>

É uma instituição independente, na medida em que tem na sua constituição todos os departamentos de que necessita para operar na área farmacêutica: Assuntos Regulamentares, Marketing, Controlo de Qualidade e Controlo Microbiológico, Investigação, Produção, Embalagem, Garantia de Qualidade, Ensaio clínicos, entre outros. Com o constante contacto com esses departamentos, percebi qual o seu papel e suas responsabilidades no ciclo do medicamento. Para além de operar noutros países, tendo estruturas próprias sedeadas nestes, a unidade de produção em Portugal (Atlantic Pharma) produz medicamentos para diferentes países, sendo que cada um tem as suas exigências e especificações próprias. Desta forma, consegui ter uma breve noção das condições exigidas individualmente pelos vários países e do trabalho necessário para colocar determinado produto em conformidade com o exigido.

#### **2.1.2 - Grande ligação da Garantia da Qualidade a outros departamentos**

A Garantia de Qualidade compreende todos os aspetos que, coletiva ou individualmente, afetam a qualidade do produto farmacêutico, assegurando a sua conformidade com os padrões de qualidade exigidos. Só desta forma podem ser utilizados no consumo da população para o uso pretendido. Por esse motivo, é talvez o departamento mais abrangente na área do medicamento, pois tem que estar em constante contacto com os restantes departamentos para assegurar que todos os requisitos necessários estão a ser cumpridos. Desta forma, foi-me permitido o contacto próximo com diversas áreas: Produção, Embalagem, Assuntos Regulamentares, Controlo de Qualidade, Controlo Microbiológico, entre outras. Este contacto permitiu-me ter uma visão geral de todo o processo referente ao medicamento, desde a preparação da documentação para Autorização de Introdução no Mercado até à sua comercialização, para que estejam disponíveis para venda ao utente. Algo que à primeira vista pode parecer simples, pode demorar meses, e é importante termos essa noção. Também me

permitiu perceber quais as tarefas realizadas em cada um desses departamentos, o que foi benéfico porque me deu uma noção geral do trabalho desempenhado pelo farmacêutico, ou restantes profissionais, nos diferentes departamentos.

### **2.1.3 - Ligação muito estreita com a produção**

O facto de a Garantia de Qualidade estar intimamente ligada à Produção, fez com que de certa forma ganhasse conhecimentos nas duas áreas. Todos os processos de fabrico passavam pelas mãos da equipa da GQ pelo que acompanhávamos todo o processo de fabrico, desde a pesagem dos constituintes até ao produto final. Ao rever os referidos processos, para assegurar que a produção foi efetuada em conformidade com os requisitos exigidos, foi-me possível ver todos os passos efetuados na produção de cada medicamento, quais os mais críticos e os de menor relevância, e todas as exigências e parâmetros a cumprir para a obtenção de um produto de qualidade. Caso houvesse alguma inconformidade, também tínhamos acesso a todos os relatórios que justificavam o sucedido, e se isso tinha ou não impacto no produto final. Desta forma, não me encontrava fisicamente na área de produção, mas sinto que adquiri muitos conhecimentos a ela referentes.

### **2.1.4 - Visita à Atlantic Pharma (AP)**

A Atlantic Pharma assegura as necessidades de produção do Grupo Tecnimede e dos seus parceiros e tem capacidade para fabricar sólidos, semi-sólidos, líquidos e suspensões. No início do meu estágio, proporcionaram-me uma visita guiada às instalações da AP, onde se inserem as áreas de Produção, Embalagem, Controlo de Qualidade (CQ) e Controlo Microbiológico (CM). Nessa visita, foi-me apresentado cada equipamento e sua função e funcionamento, bem como as áreas onde estes se inserem, o que se revelou essencial no decorrer do estágio, principalmente para compreender as diferentes etapas de produção do medicamento, que se realizam em equipamentos próprios e complexos. Perceber o seu funcionamento foi uma mais valia na revisão dos processos de fabrico. A visita aos laboratórios de CQ e CM ajudou não só a perceber quais as análises que maioritariamente se fazem aos medicamentos produzidos, mas também no caso concreto do CM, os testes que se fazem periodicamente às instalações e à água, para atestar a sua conformidade microbiológica.

### **2.1.5 - Diversidade de tarefas realizadas**

Na GQ existe uma grande variedade de tarefas a executar, desde:

- PQR (*Product Quality Review*) e relatórios de validação dos processos de fabrico;
- Revisão de processos de fabrico e embalagem;
- Revisão, atualização e criação de SOP's (*Standard Operating Procedures*);

- Constante atualização da lista de prazos de validade dos produtos;
- Gestão de reclamações (efetuar o seu registo, abrir um processo de investigação e elaborar um relatório de resposta);
- Metrologia (calibração e/ou qualificação de aparelhos e equipamentos);
- Validação de processos de fabrico e embalagem, entre outros.

A equipa depositou uma grande confiança em mim, permitindo a minha participação em todas as tarefas referidas, contribuindo para o aumento do meu conhecimento e competência na área.

### **2.1.6 - Trabalho coordenado entre várias equipas**

Como já foi referido, a GQ está intimamente ligada a vários departamentos pelo que é necessária a cooperação entre as várias equipas que os constituem. Algumas das tarefas de GQ estavam dependentes do trabalho de outros departamentos, assim como outros departamentos dependiam do nosso trabalho. Para a sua conclusão no tempo pretendido e com a requerida qualidade, era indispensável a colaboração e organização entre as diferentes equipas. Assim sendo, aprendi a trabalhar não só com a minha equipa, mas também com outras com as quais me encontrava envolvida diariamente. Sem dúvida que foi uma mais-valia que levarei para o futuro, onde em todos os trabalhos (e na vida) é necessário haver cooperação entre os diferentes profissionais e/ou pessoas.

### **2.1.7 - Instalação de novos equipamentos**

No período em que decorreu o meu estágio, estavam a ser realizadas obras na área da Produção, para o aumento das instalações e aumento do número de equipamentos, conferindo ao GT uma maior capacidade de fabrico de produtos farmacêuticos. Com a aquisição de novos equipamentos, coube à GQ a constante monitorização da sua instalação, acompanhando todos os testes efetuados nestes. Além de os acompanhar, era necessário no final avaliar todos os resultados obtidos para garantir que a nova aquisição cumpria todos os requisitos exigidos. Houve casos em que os resultados não foram os esperados e a GQ teve que pedir a repetição de certos testes. Assim sendo, tive noção do que é o dossier de um equipamento, as informações que continha, assim como o analisar.

## **2.2 - Pontos Fracos**

### **2.2.1 - Tempo de estágio curto**

A GQ é um dos setores considerados mais relevantes da Indústria Farmacêutica. Tem tarefas que vão desde a seleção de fornecedores, passando por todas as etapas do processo de fabrico e libertação dos produtos, para que estejam acessíveis aos consumidores. Por estar

envolvida em múltiplas áreas relacionadas com o medicamento, existem várias tarefas a desempenhar, todas elas muito diferentes. Teria sido vantajoso um estágio mais prolongado, para que tivesse a oportunidade de consolidar os conhecimentos que adquiri, permitindo-me ser mais autónoma na realização de certas tarefas. Quando me senti integrada na equipa e confiante para assumir certas tarefas, estava o estágio a terminar. No entanto reconheço a grande oportunidade que me foi dada e aproveitei para aplicar os meus conhecimentos e adquirir novos, que serão uma ferramenta útil caso opte por uma carreira na indústria farmacêutica, onde a experiência prévia é fundamental e um dos requisitos maioritariamente exigidos.

### **2.2.2 - Impossibilidade de acompanhar auditorias externas**

Anualmente a GQ elabora um programa anual de auditorias internas com uma previsão das auditorias a realizar nesse ano. A periodicidade decorre da necessidade de verificar de forma independente se os requisitos a auditar estão a ser cumpridos e se revelam eficazes relativamente às exigências especificadas, sendo que deve ser realizada pelo menos uma por ano. Infelizmente, no curto espaço de tempo em que se realizou o meu estágio, não se realizou nenhuma auditoria interna. O mesmo não aconteceu com auditorias externas. Durante os três meses de estágio realizaram-se algumas. Estas são sugeridas pelos clientes do Grupo Tecnimede, com o intuito de verificar o processo de fabrico e atividades relacionadas, o cumprimento de especificações acordadas e dos requisitos de Boas Práticas de Fabrico. Acompanhei o processo, desde a preparação de toda a documentação necessária para os auditores até ao relatório final, onde constavam, caso existissem, as não conformidades maiores, menores e/ou oportunidades de melhoria. No entanto, nunca pude acompanhar os auditores na sua visita às instalações, assim como participar nas reuniões existentes. Por um lado, não fazia parte do plano de estágio, e por outro, é sempre uma altura de grande tensão pois da auditoria resulta uma avaliação positiva ou negativa, que pode comprometer a futura colaboração do cliente com o GT. Por esse motivo, só participam na visita e nas reuniões as pessoas estritamente necessárias, nas quais eu não me incluía.

## **2.3 - Oportunidades**

### **2.3.1 - Aproximação facilitada à realidade profissional**

O estágio deu-me a oportunidade de desenvolver novas competências profissionais, pessoais e interpessoais, ferramenta essencial para um futuro farmacêutico ter a capacidade de enfrentar novos desafios. Penso que o facto de ter realizado este estágio em Indústria Farmacêutica, de carácter opcional, será um fator diferenciador no futuro. No presente,

permitiu-me aproximar da realidade profissional nesta área, que é bastante diferente da Farmácia Comunitária.

### **2.3.2 - Possibilidade de integrar a “Academia de Talentos”**

Anualmente o GT desenvolve o projeto “Academia de Talentos”, que dá a oportunidade a pessoas licenciadas, principalmente jovens, de adquirir e consolidar conhecimentos e competências na área da Indústria Farmacêutica durante aproximadamente 9 meses. Nesse período, é dada formação teórica sobre os vários departamentos e feito um estágio de observação nesses mesmos departamentos culminando, por fim, num estágio num dos departamentos.

Antes da conclusão do estágio curricular, foi-me proposto frequentar a academia, numa das áreas disponíveis. Para aumentar a minha experiência, aceitei o desafio, iniciando em Setembro um novo estágio em GQ. Penso que seja uma grande oportunidade, dado o meio competitivo e de difícil acesso que Indústria Farmacêutica se revelou.

## **2.4 - Ameaças**

### **2.4.1 - Outro estagiário**

No período em que foi realizado o meu estágio, estava a decorrer a academia de talentos, pelo que quando cheguei ao departamento de GQ já lá se encontrava uma estagiária. O seu estágio tinha iniciado em outubro, pelo que naquele momento tinha mais conhecimento do funcionamento do departamento, e suas tarefas, do que eu, que iniciava numa área completamente nova e fora do meu domínio. Ao longo do estágio fui adquirindo competências para a realização das tarefas, no entanto, encontrava-me em desvantagem, pelo que em algumas ocasiões as tarefas eram entregues à pessoa mais experiente e que realizasse a tarefa mais rapidamente, por uma questão de gestão de tempo. No entanto, sempre existiu muita ajuda e cooperação entre as duas, uma vez que o nosso objetivo era o mesmo: aprender o máximo possível e realizar as tarefas propostas com distinção.

### **2.4.2 - Difícil acesso à carreira em Indústria Farmacêutica**

A Indústria Farmacêutica, neste momento, é um mercado extremamente competitivo e de difícil acesso. Talvez o requisito mais exigido seja a experiência profissional na área, o que para um recém-licenciado, é praticamente impossível. Para além disso, todos os estudantes quando terminam o seu percurso académico, estão praticamente em pé de igualdade no que toca à sua formação base. O que o pode diferenciar de outros é a participação em atividades extracurriculares, tais como estágios e formações, o que exige um esforço adicional por parte do aluno. Por esse motivo este estágio foi uma enorme oportunidade para mim, que tenciono

enveredar pela área. No entanto, tenho perfeita noção das dificuldades que se avizinham para entrar neste mundo.

### **3- Conclusão**

Com a conclusão de mais um estágio, sinto-me mais ligada à área farmacêutica e às suas diferentes saídas profissionais. Considero que me foi dada uma grande oportunidade, pelo que me esforcei por dar o meu melhor em todos os desafios que me foram propostos, de forma a manter o bom nome dos alunos que concluem os estudos em MICF na Universidade de Coimbra.

Confirmei que a carreira na área farmacêutica exige uma grande responsabilidade, empenho e dedicação. Tanto a nível precoce, no desenvolvimento e produção de medicamentos, como a nível de aconselhamento e acompanhamento do utente. No entanto, sinto-me preparada para agarrar essa responsabilidade.

Finda esta etapa, tenho uma visão mais abrangente do que é o mercado de trabalho e quais as suas dificuldades, mas com a certeza que me sinto realizada com a minha escolha pelo curso escolhido. Estou certa de que a oportunidade que me foi dada, e a qual agradeço, será uma mais valia para o meu futuro.

## Referências Bibliográficas

- <sup>(1)</sup> GRUPO TECNIMEDE - **Grupo Tecnimede: Sobre.** [Acedido a 1 de agosto de 2019]. Disponível em: <https://www.tecnimede.com/pt/grupo-tecnimede/sobre>
- <sup>(2)</sup> GRUPO TECNIMEDE - **Grupo Tecnimede: Missão e Valores.** [Acedido a 1 de agosto de 2019]. Disponível em: <https://www.tecnimede.com/pt/grupo-tecnimede/missao-e-valores>

## **Parte III**

**Desregulação de pH - Um aliado importante na  
evolução do cancro**

## Resumo

O cancro é talvez uma das doenças mais temida por parte da população de todo o mundo. Todos os dias novos casos são diagnosticados, e todos os dias pessoas morrem devido à doença, pelo que existe a necessidade de saber mais sobre a patologia em si, assim como a sua possível prevenção e cura. Com o decorrer dos anos, e o aumento da sua incidência, tem havido uma grande preocupação da comunidade científica acerca deste tema. Ao contrário de outras áreas onde o conhecimento se encontra estagnado, no caso do cancro, existem a todo o momento novas descobertas, principalmente novas formas de tratamento ou tentativas de melhoria para as já existentes. Graças a estes avanços, tem-se verificado o aumento da taxa de sobrevivência na maioria dos tipos de cancro, assim como a melhoria da qualidade de vida dos doentes.

Existe uma grande variedade de cancros, todos eles com as suas características próprias. No entanto, todos parecem ter um fator comum: o pH desregulado. Algo que à primeira vista pode não parecer relevante, tem uma grande importância, uma vez que afeta vários aspetos relacionados com o desenvolvimento do tumor, como: evolução, formação de metástases, fuga ao sistema imunitário, resistência a tratamentos convencionais, entre outros.

Na presente monografia irei abordar a importância de um pH desregulado na evolução e tratamento do cancro.

**Palavras-chave:** Cancro, pH, Metabolismo, Microambiente tumoral, Metástases, Sistema Imunitário, Tratamento.

## **Abstract**

Cancer is one of the most feared diseases among the population worldwide. Every day new cases are diagnosed, and every day people die from the disease, so there is a need to know more about the condition itself, as well as its possible prevention and cure. Over the years it's increasing the incidence and there has been great concern from the scientific community about this topic. Unlike other areas where knowledge is stagnant, in the case of cancer, there are always new discoveries, especially in new forms of treatment or attempts to improve existing ones. Thanks to these advances, the survival rate of most cancers has increased, as well as the improved quality of life of the patients.

There is a wide variety of cancers, all with their own characteristics. However, they all seem to have one common factor: dysregulated pH. Something that may not seem relevant at first sight it is of great importance as it affects various aspects related with tumor development, such as evolution, metastasis formation, immune system scape, resistance to conventional treatments, among others.

In the present monograph I will approach the importance of dysregulated pH in the evolution and treatment of cancer.

**Keywords:** Cancer, pH, Metabolism, Tumor Microenvironment, Metastasis, Immune System, Treatment.

## Lista de Abreviaturas

**AMPK** - Proteína Cinase Ativada por Adenosina Monofosfato

**ATP** - Adenosina Trifosfato

**ATPase** - Adenosinatrifosfatase

**CA** - Anidrase Carbónica

**Cdk** - Cinase Dependente de Ciclinas

**DAMP** - Padrão Molecular Associado a Perigo

**DC** - Célula Dendrítica

**ECM** - Matriz Extracelular

**GEF** - Fatores Trocadores de Nucleótidos de Guanina

**GLUT** - Transportador de Glicose

**HIF** - Fator ativado por hipóxia

**IFN- $\gamma$**  - Interferão  $\gamma$

**IL-2, IL-4, IL-12, IL-17, IL-2Ra** - Interleucina 2, Interleucina 4, Interleucina 12, Interleucina 17 e Interleucina 2Ra

**iNOS** - Isoforma Induzível da Sintetase de Óxido Nítrico

**LDH / LDHA** - Lactato Desidrogenase / Lactato Desidrogenase A

**MCT** - Transportador de Monocarboxilato

**MDRI** - Proteína de Resistência a Múltiplos Fármacos I

**MDSC** - Célula Supressora Derivada de Mielóide

**MHC-I/II** - Complexo Principal de Histocompatibilidade

**miRNA** - Micro RNA

**MMP** - Metaloproteinase de Matriz

**MTI-MMP** - Metaloproteinase Ligada à Membrana

**mtDNA** - DNA Mitocondrial

**mTOR/mTORC** - Alvo de rapamicina em mamíferos / Complexo alvo da rapamicina em mamíferos

**NADH/NAD<sup>+</sup>** - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (dois estados de oxidação)

**NADPH** - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

**NFAT**- Fator Nuclear de Células T Ativadas

**NF-κB** - Fator nuclear κB

**NHE** - Trocador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

**NK** - Célula Natural Killer

**NO** - Óxido Nítrico

**OxyPhos** - Fosforilação Oxidativa

**PAMP** - Padrão Molecular Associado a Patogénio

**PDH** - Piruvato Desidrogenase

**PDK** - Piruvato Desidrogenase Cinase

**PFK-I** - Fosfofrutocinase-I

**pHe** - pH extracelular

**pHi** - pH intracelular

**PKM** - Piruvato Cinase

**ROS** - Espécies Reativas de Oxigénio

**TADC** - Célula Dendrítica Associadas ao Tumor

**TAM** - Macrófago Associado a Tumor

**TCA** - Ciclo do Ácido Tricarboxílico

**TCR** - Recetor de Células T

**TME** - Microambiente Tumoral

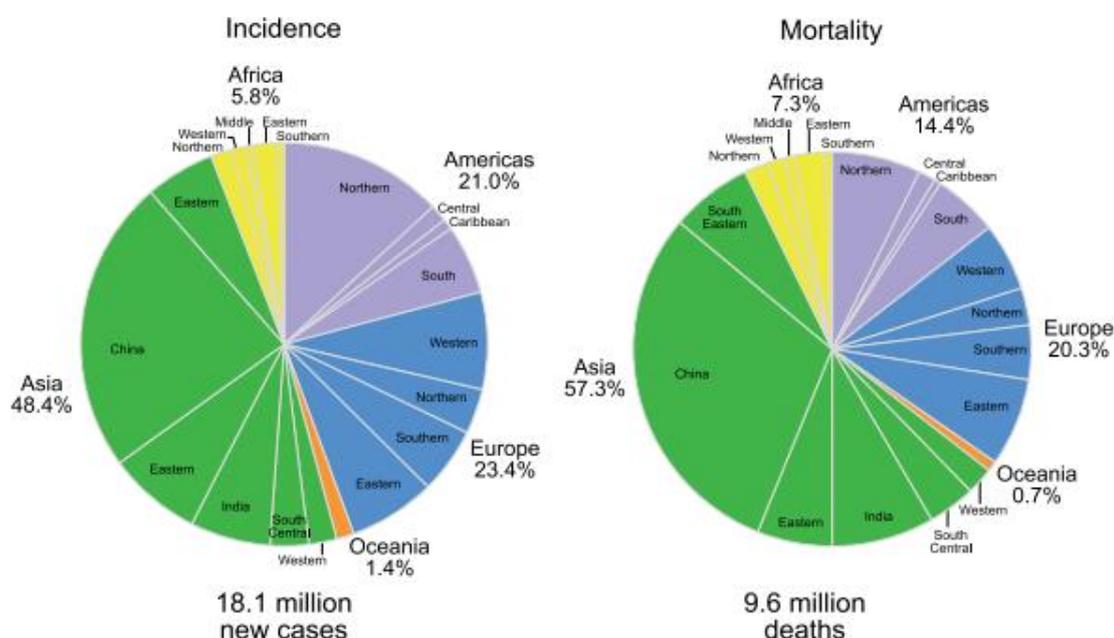
**TNF-α** - Fator de necrose tumoral

**Treg** - Célula T Reguladora

**VEGF** - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

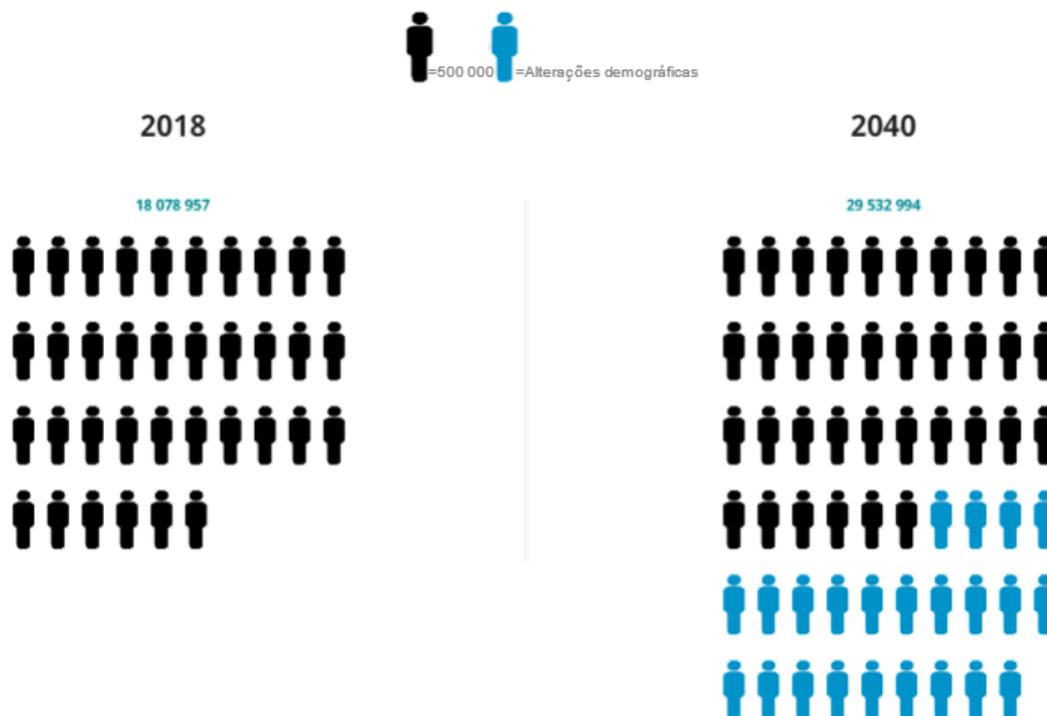
## I- Introdução

No mundo inteiro, milhões de pessoas vivem com o diagnóstico de cancro e diariamente são diagnosticados novos casos.<sup>(1)</sup> As razões para o aumento da incidência e da mortalidade são complexas, mas estão, em grande parte, ligadas ao envelhecimento da população e desenvolvimento socioeconómico, que em muitos casos aumentou os fatores de risco. Ao longo do ano de 2018 estima-se que foram descobertos 18,1 milhões de novos casos no mundo, sendo que 9,6 milhões de pessoas acabaram por morrer devido à patologia (Figura 1).<sup>(2)</sup>



**Figura 1** - Representação (em forma de gráfico) da distribuição de casos e mortes por área do mundo em 2018 para ambos os sexos. (Adaptado de Bray F. et al. (2018))<sup>(2)</sup>

No que se refere à Europa, chegou aos 3,9 milhões de diagnósticos e 1,9 milhões de mortes.<sup>(3)</sup> No caso concreto de Portugal, no ano de 2018 surgiram cerca de 58 mil novos casos.<sup>(4)</sup> Com base nestes números, podemos concluir que é inquestionável a necessidade de investigação nesta área. Até porque estima-se que o número de casos irá aumentar significativamente nos próximos anos (Figura 2).<sup>(5)</sup>



**Figura 2** - Número estimado de incidência de casos em 2018 e para 2040, para todos os tipos de cancro, todas as idades e ambos os sexos. (Adaptado de *Global Cancer Observatory*)<sup>(5)</sup>

Ao longo do tempo tem-se aprofundado o conhecimento existente sobre este tema, desde as suas causas, a forma como se desenvolve e cresce, e como se previne. Também tem havido uma busca incessante por novas formas de deteção e tratamento, tendo como principal objetivo a qualidade de vida do portador da doença.<sup>(1)</sup>

Cancro pode ser definido como um crescimento anormal de células. Estas células, provenientes de diferentes tecidos e/ou órgãos, têm a capacidade de se replicar continuamente, uma vez que desenvolvem estratégias que lhes permitem fugir aos mecanismos de controlo de multiplicação celular. O sistema imunitário, por sua vez, tem a capacidade de identificar e destruir estas células que apresentam alguma anomalia, quando estas ainda se encontram em número limitado, por isso este evento não é crítico para o desenvolvimento do tumor. O grande problema reside no facto de estas células também possuírem mecanismos que lhes possibilita a fuga ao sistema imunitário, o que culmina no aumento indefinido do seu número.<sup>(6)</sup>

Para melhor descrever e prever as características fenotípicas do cancro tem sido dada particular importância ao microambiente tumoral, que é substancialmente diferente do microambiente que caracteriza as restantes células.<sup>(7)</sup> Com o constante avanço da tecnologia e crescente investigação nesta área, chegou-se à conclusão que o pH das células cancerígenas se encontra alterado. Por norma, estas têm um pH intracelular (pHi) mais elevado e um pH

extracelular (pHe) mais baixo quando comparado com células normais. Esta particularidade pode ter influência nos processos envolvidos na proliferação, adaptação metabólica, formação de metástases e tumorigênese das células cancerígenas, tema sobre o qual vai incidir este trabalho.<sup>(8)</sup>

## 2- Reprogramação metabólica das células cancerígenas

As principais características dos tumores, transversais a todos eles, são: multiplicação ilimitada, inativação de supressores de crescimento, promoção de invasão e formação de metástases, resistência à apoptose, eliminação da limitação de energia, manutenção da sinalização proliferativa, capacidade de fuga ao sistema imunitário, estimulação da angiogênese, inflamação aumentada, instabilidade do genoma e mutação.<sup>(9)</sup> Sabe-se que o ambiente onde se encontra envolto o tumor é caracterizado por insuficiência sanguínea e baixo pH, baixo nível de nutrientes e glicose, e deficiência em oxigênio.<sup>(7)(10)</sup> Estas não são, de todo, as condições ideais para a proliferação e sobrevivência de células, uma vez que são o oposto daquelas que usualmente são necessárias para manter a vida. Tornou-se claro que as células cancerígenas se adaptaram a este meio e usaram em seu benefício o facto de ser um ambiente adverso para a sobrevivência da maioria das células.<sup>(7)</sup>

As células cancerígenas estão sob pressão seletiva para explorar ao máximo as condições microambientais favoráveis e superar as condições desfavoráveis, com as influências ambientais a determinar significativamente a evolução do tumor. Um dos mecanismos adotados no seu metabolismo, que se revela uma das maiores particularidades do seu microambiente, é privilegiar a glicólise (metabolismo anaeróbio) em vez da fosforilação oxidativa (metabolismo aeróbio), mesmo na presença de oxigênio, conhecido por efeito de Warburg.<sup>(11)</sup> Na glicólise, a glicose é convertida em piruvato, lactato e iões de hidrogênio, havendo também produção de compostos de elevada energia, ATP e NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina).<sup>(8)(12)</sup> No metabolismo glicolítico, resumidamente:

- i) As células cancerígenas, em comparação com células normais, exibem um aumento drástico na captação de glicose, gerando mais metabolitos glicolíticos e uma quantidade significativa de ATP, ambos necessários para o crescimento e divisão celular;
- ii) Uma fração substancial do carbono da glicose é desviado para múltiplas vias biossintéticas, em vez de originar piruvato. Na verdade, as células cancerígenas usam uma variedade de estratégias para retardar a última etapa da glicólise que é catalisada

pela piruvato cinase (PKM), permitindo a acumulação de intermediários glicolíticos para este fim;

- iii) A maioria dos piruvatos formados é convertido em lactato, através da ação da lactato desidrogenase (LDH) e excretado para o exterior.<sup>(13)</sup>

No entanto, a glicólise é muito menos eficiente na produção de ATP. São produzidas apenas duas moléculas de ATP por cada molécula de glicose enquanto que todo o ciclo glicólise-ciclo de Krebs-fosforilação oxidativa, que leva à oxidação completa da molécula de glicose, dá origem a trinta e oito ATP.<sup>(14)(15)</sup> Mais importância tem o facto de durante a glicólise se produzirem dois prótons, o que leva a um aumento da carga ácida e rápida diminuição do pHi, que caso não seja compensada por mecanismos que conduzam à expulsão de prótons da célula pode ser letal. Esta compensação, irá culminar na acidificação do pHe e alcalinização do pHi.<sup>(14)</sup> Assim, em comparação com células normais, verifica-se que as células cancerígenas apresentam um pHi de aproximadamente 7,3-7,6 (em vez de 7,2), enquanto que o pHe varia entre 6,8-7,0 (em vez de 7,4).<sup>(8)(16)</sup> Estes factos levam-nos a questionar o motivo pela qual as células cancerígenas utilizam maioritariamente o metabolismo glicolítico numa fase ainda muito precoce do seu desenvolvimento e ao longo do seu ciclo de vida.<sup>(15)</sup>

## 2.1 - Efeito de Warburg

Numa célula normal, a glicose é absorvida graças aos transportadores de glicose membranares, os GLUT. Segue-se a sua metabolização em piruvato, no citosol, através de um processo de múltiplos passos conhecido como glicólise, que também produz uma pequena quantidade de ATP.<sup>(17)(18)</sup> Esse mesmo piruvato é importado predominantemente para a matriz mitocondrial, onde é oxidado a acetil-coenzima A pelo complexo piruvato desidrogenase (PDH). A acetil-CoA é então introduzida no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), seguindo-se a fosforilação oxidativa (OxyPhos) para geração de ATP de alta eficiência.<sup>(13)(18)</sup> No modelo convencional da dinâmica da energia celular, assume-se que a disponibilidade de oxigénio determina a via metabólica ideal para a produção de ATP, de forma a que a glicólise, como sendo um metabolismo menos eficiente, sirva apenas como reserva para períodos de hipóxia.<sup>(19)</sup> No entanto, como será descrito a seguir, não é só a falta de oxigénio que determina qual o metabolismo a ser utilizado.

Embora os cancros humanos apresentem uma gama diversificada de perfis metabólicos, o fenótipo metabólico de Warburg é um traço generalizado associado à maioria.<sup>(13)</sup> A glicólise aeróbica é difícil de conciliar com o modelo convencional de carcinogénese, onde a produção ineficiente de ATP parece inconsistente com a maximização da aptidão celular para a replicação. No entanto, a fosforilação oxidativa, embora produza números máximos de ATP,

é lenta para responder a flutuações nas necessidades da célula, ao contrário da glicólise que, embora menos eficiente, pode aumentar a produção e o fluxo de ATP muito mais rapidamente.<sup>(18)(19)(20)</sup> Ao longo da evolução do conhecimento sobre este tema, percebeu-se que uma taxa alta de produção de ATP, mas menor rendimento, pode ser uma vantagem seletiva ao competir em recursos energéticos compartilhados e limitados.<sup>(20)</sup> Numa célula em constante crescimento e replicação, as vias anabólicas, para além de altos níveis de energia, necessitam de uma maior expressão de genes de biossíntese, como aqueles envolvidos no metabolismo de nucleótidos e aminoácidos.<sup>(15)(20)</sup> Assim sendo, a produção ineficiente de ATP foi proposta como um mecanismo adaptativo, que pode ser usado com um meio para satisfazer as necessidades biossintéticas da proliferação descontrolada das células.<sup>(20)(21)</sup>

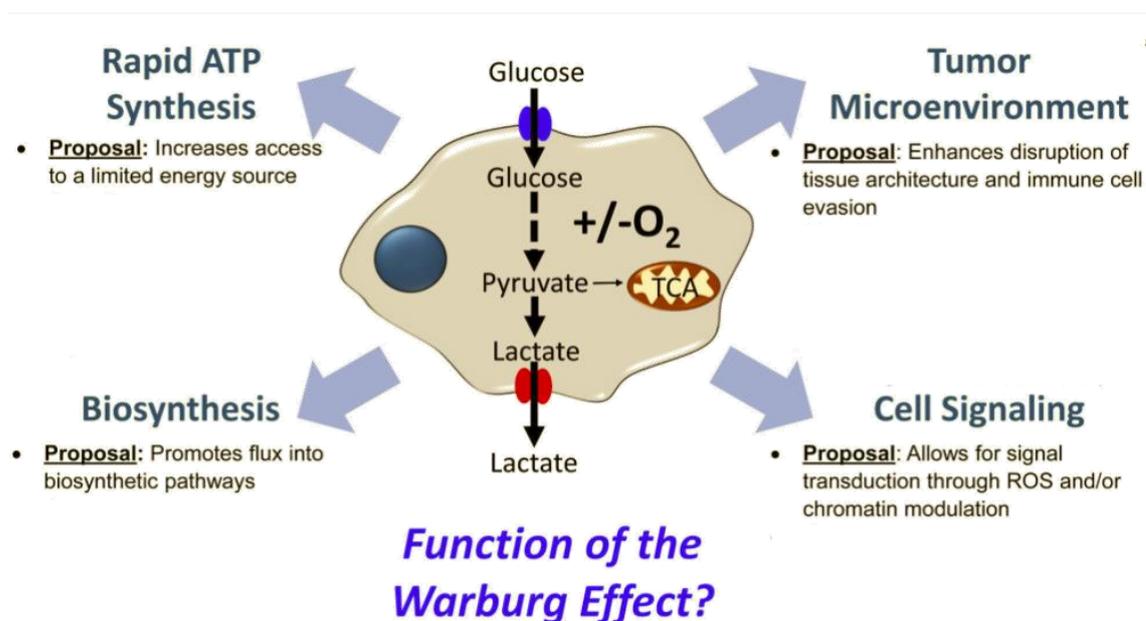
Outra possível explicação para esta mudança de metabolismo assenta na ideia de que o volume físico disponível por célula pode limitar o número de mitocôndrias e, portanto, qualquer energia e biomassa que excedam capacidade mitocondrial limitada precisa ser produzida a partir da glicólise.<sup>(20)</sup> Estes são talvez os fatores mais importantes que conduzem ao referido efeito de Warburg.

Foi também proposto que o efeito de Warburg confere funções de sinalização direta às células tumorais. Duas áreas envolvidas na função de sinalização são a geração e modulação de ROS (espécies reativas de oxigénio) e a modulação do estado da cromatina. No primeiro caso, a manutenção de um nível equilibrado de ROS é essencial.<sup>(20)</sup> Estas são constantemente geradas como subprodutos do metabolismo oxidativo mitocondrial.<sup>(13)</sup> O seu excesso danifica as membranas celulares, ácidos nucleicos e tem outros efeitos deletérios. Em quantidade insuficiente perturba processos de sinalização que são benéficos para a proliferação celular. Uma vez que o efeito de Warburg causa alterações no potencial redox mitocondrial, a produção de ROS é diretamente afetada. Estas utilizam NADH para o transporte de eletrões. No entanto, quando existem elevadas taxas de glicólise, este NADH é utilizado na conversão de piruvato em lactato, via LDH, deixando a mitocôndria com défice de elementos redutores.<sup>(20)</sup>

Para além disso, foi documentado que a acetil-CoA (substrato para a acetilação de histonas), pode ser regulado pelo fluxo de glicose. O estado de estrutura da cromatina é responsável pela regulação de diferentes funções celulares, incluindo a reparação de DNA e a transcrição de genes. A remoção de glicose leva à perda de acetilação em várias histonas e conseqüente diminuição da transcrição de genes envolvidos no metabolismo da glicose. Níveis elevados de acetil-CoA (e glicose) podem ser suficientes para conduzir as células para a fase

de crescimento via acetilação de histonas.<sup>(20)</sup> Estas múltiplas evidências apontam para a glicólise com funções de sinalização celular.

A geração excessiva de lactato, proveniente do metabolismo adaptativo, para além de ser um dos grandes responsáveis pela acidificação extracelular, parece ser um uso ineficiente de recursos celulares uma vez que cada lactato excretado da célula desperdiça três carbonos que poderiam ser utilizados para a produção de ATP ou na biossíntese de precursores macromoleculares. No entanto, é eficaz porque permite a incorporação mais rápida de carbono em biomassa, o que, por sua vez, facilita a rápida divisão celular. Para além disso, existem mecanismos que permitem que este lactato seja reciclado e utilizado no metabolismo oxidativo.<sup>(15)</sup> Outro ponto importante é o facto de a conversão de piruvato em lactato oxidar o NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) a  $\text{NAD}^+$ , que é necessário para que a reação de glicólise ocorra. Assim sendo, repõe eficientemente  $\text{NAD}^+$  para célula, onde este é limitado e está a ser altamente consumido.<sup>(13)</sup>



**Figura 3** - Resumo das funções propostas para o efeito de Warburg. (Adaptado de Liberti M.V. et al. (2016))<sup>(20)</sup>

## 2.2- Fator induzido por hipóxia I (HIF-1)

O desenvolvimento de hipóxia intratumoral é uma característica quase universal, que ocorre ao mesmo tempo que o rápido desenvolvimento do tumor, onde o elevado aumento da densidade de células tumorais num curto espaço de tempo, associado a uma vasculatura tumoral instável, inibe o acesso à corrente sanguínea. É um fator de prognóstico negativo uma vez que melhora a invasibilidade, angiogénese, potencial metastático e desvio metabólico das células tumorais. As mudanças adaptativas do cancro são primariamente mediadas pelo fator

de transcrição HIF, um regulador mestre que equilibra a oferta e a demanda de oxigénio.<sup>(13)(14)(22)</sup> Os HIFs são uma família de reguladores transcricionais, compostos por duas subunidades, que induzem um conjunto de genes alvo específicos:  $\alpha$  regulada por oxigénio e  $\beta$  independente de oxigénio.<sup>(22)</sup> Existem três isoformas: HIF-1, HIF-2 e HIF-3. O HIF1 é expresso em todas as células enquanto que o HIF-2 e HIF-3 estão presentes somente em alguns tecidos.<sup>(18)</sup>

O HIF-1, para além de estar envolvido na ativação da sinalização inflamatória associada ao tumor, é um importante mediador da troca metabólica que nele ocorre, através da estimulação da expressão e atividade de algumas enzimas glicolíticas, providenciando à célula o suporte para que ocorra o efeito de Warburg. Alguns dos seus alvos são transportadores e enzimas tais como: transportadores de glicose 1 e 3 (GLUT1 e GLUT3), transportador de monocarboxilato 4 (MCT4), trocador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1) e LDH.<sup>(22)</sup> Ao contribuir para a troca de metabolismo e para o aumento de proteínas reguladoras de pH, está a favorecer a acidificação do ambiente externo à célula.<sup>(10)(22)</sup>

Outra ação importante do HIF-1 é a ativação da transcrição de PDK1 e PDK3 (piruvato desidrogenase cinase 1 e 3), que irão inativar a PDH, impedindo que o piruvato se converta em acetil-CoA através do ciclo de Krebs. Também atuam sobre a LDH, aumentando a conversão de piruvato em lactato. Desta forma desvia o piruvato da oxidação mitocondrial, diminuindo ao mesmo tempo a quantidade de ROS formado, protegendo as células do stress oxidativo.<sup>(13)(18)(23)</sup>

A mutação de genes é uma realidade bem conhecida quando nos referimos ao cancro. Um dos genes mais comumente mutados é o p53, um fator de transcrição que regula amplamente diversas funções biológicas, tendo um papel fundamental no balanço entre glicólise e OxyPhos. Em condições normais, promove o OxyPhos. Uma vez mutado e juntamente com o HIF-1, é responsável pelo fenótipo glicolítico no cancro.<sup>(13)(18)</sup>

### **2.3 - Efeito de Warburg e o metabolismo oxidativo (OxyPhos)**

Inicialmente Warburg considerou que a utilização da glicólise aeróbica pelas células do tumor prejudicava a sua função mitocondrial, ideia que veio a ser refutada por estudos realizados mais tarde.<sup>(18)(24)(25)(26)</sup> A utilização da glicólise é predominante, o que não invalida o facto da função mitocondrial estar intacta. A taxa absoluta de respiração mitocondrial nas células cancerígenas permanece comparável às células normais, isto é, as células cancerígenas continuam capazes de utilizar a fosforilação oxidativa, sendo para muitas uma importante fonte de energia. Existe, portanto, um fluxo de glicose profundamente elevado neste tipo de células,

que é predominantemente direcionado para a fermentação do lactato, não havendo um aumento proporcional no metabolismo oxidativo.<sup>(13)</sup>

Smolkova *et al.* (2011)<sup>(27)</sup> propuseram quatro ondas de regulação metabólica durante a carcinogênese:

- Onda I - Transformação de células estaminais cancerígenas (CSC) mediado pela ativação de oncogenes.

- Onda II - Alta taxa de proliferação e angiogênese comprometida causam hipóxia. Esta induz o HIF, resultando numa elevada expressão de genes glicolíticos.

Nas ondas I e II, o metabolismo das células favorece muito a glicólise e inibe a OxyPhos, ou seja, o efeito de Warburg.<sup>(18)</sup>

- Onda III - Sustentar a alta taxa de proliferação das células e suas necessidades de energia conduz as células a períodos de aglicemia e falta de nutrientes. Nesta fase, a função do OxyPhos mitocondrial é parcialmente restaurada devido a reprogramação genética.

- Onda IV - Revitalização da mitocôndria.<sup>(18)(27)</sup>

Desta forma se comprova que o fenótipo de Warburg não é exclusivo e a diminuição da função da mitocôndria não se verifica.<sup>(18)(27)</sup>

Supondo que a quantidade de ATP é constante e a função da OxyPhos se encontra diminuída, a função da glicólise tem que ser aumentada para manter o balanço energético da célula. Estima-se que, por norma, a produção de ATP pela via glicolítica não exceda 60% da quantidade total necessária, pelo que a via oxidativa contribui com a restante parcela para que esta seja alcançada.<sup>(18)</sup> Assim sendo, ambas cooperam para manter o balanço energético da célula, a fim de permitir que esta cresça e prolifere, contribuindo para a progressão do cancro.<sup>(20)</sup>

## 2.4 - pH e regulação do metabolismo

A glicólise aeróbica é o resultado da combinação de vários fatores como a ativação de oncogenes, perda de supressores do tumor, o microambiente hipóxico, mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) e a origem dos tecidos onde o tumor se desenvolve.<sup>(18)</sup> Do efeito de Warburg surge um pH desregulado que parece influenciar o metabolismo usado.<sup>(8)(18)</sup>

Há cada vez mais evidências que tanto o pH<sub>i</sub> alcalino como o pH<sub>e</sub> ácido são importantes na condução da crescente dependência da glicólise e diminuição da dependência da fosforilação oxidativa. O pH<sub>i</sub> alcalino, mesmo que ligeiramente acima dos níveis neutros, estimula a atividade de enzimas glicolíticas, como a fosfofrutocinase-I (PFK-I), e inibe a gliconeogênese.<sup>(14)(21)</sup> O pH<sub>i</sub> constantemente elevado pode aumentar a regulação alostérica da PFK-I em mais de 100 vezes.<sup>(8)(12)</sup> Também a atividade de LDH, que converte piruvato em

lactato e regenera  $\text{NAD}^+$  para a glicólise, é máxima a pH 7,5.<sup>(8)(21)</sup> Para suportar esta ideia, experiências comprovaram que a alcalinização maligna leva à ativação inicial da glicólise aeróbica.<sup>(12)</sup> Também o pH baixo demonstrou ter efeitos profundos na expressão genética de células tumorais, incluindo genes envolvidos na glicólise.<sup>(14)</sup>

A dinâmica complexa de interação pH-metabolismo envolve um ciclo vicioso desde muito cedo: a alcalinização dirigida ao oncogene aumenta a glicólise e proliferação, gerando uma necessidade de alto consumo de energia que mantém uma alta produção de prótons que, através de sistemas estimulados de transporte de efluxo de prótons alcaliniza ainda mais a célula, o que conduz a uma redução da OxyPhos e aumento a glicólise.<sup>(14)</sup> Desta forma, de entre os muitos fatores alostéricos que controlam a glicólise, o pH e/ou concentração de íons de hidrogénio, tornou-se o fator mais significativo. Na presença de níveis adequados de oxigénio, o pH intracelular desempenha um papel fundamental na determinação do modo como as células do tumor obtêm energia.<sup>(12)</sup>

## 2.5 - Trocador de $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE1)

O efeito de Warburg é capaz de regular a expressão de transportadores cruciais para a captação de glicose e envolvidos no transporte de subprodutos do metabolismo da glicose. Como consequência das alterações da expressão funcional de bombas iónicas situadas na membrana plasmática, facilita-se a distribuição de  $\text{H}^+$  para o fluido extracelular.<sup>(17)(28)</sup> Alguns desses transportadores incluem: MCTs (envolvidos no transporte de monocarboxilatos, como o piruvato e lactato), transportadores  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  e NHE1, NHE2, NHE4.<sup>(10)(17)</sup> No que se refere a transportadores responsáveis pela regulação de pH, o NHE1, a isoforma mais abundante dos trocadores NHE, é um dos bioelementos mais bem estudados. Este é um regulador de pH do citoplasma e de organelos intracelulares, assim como é responsável por outras atividades biológicas e fisiológicas tais como: homeostase, adesão, migração e proliferação.<sup>(17)(28)(29)</sup> É uma proteína transportadora de membrana, constituída por dois domínios:

i) Um domínio de membrana N-terminal hidrofóbico que contém 1 a 500 aminoácidos e uma estrutura secundária com 12 elementos transmembranares. A atividade de transporte é atribuída a este domínio uma vez que o N-terminal é responsável pela troca de  $\text{H}^+$  intracelular pelo  $\text{Na}^+$  extracelular, mantendo assim um  $\text{pH}_i$  elevado.<sup>(28)(30)</sup>

ii) Um domínio citoplasmático, com cerca de 501 a 815 aminoácidos (cauda C-terminal).<sup>(28)(30)</sup> É ativado durante a transformação dependente de oncogenes mediada por vários estimulantes presentes no microambiente como: fatores de crescimento, hormonas, enzimas e bioelementos metabólicos (baixa quantidade de nutrientes, pH ácido e hipóxia).<sup>(17)</sup>

O NHEI está sempre ativo na maioria das células, podendo o valor de pHi oscilar até 7,8.<sup>(29)(30)</sup> Esta secreção de prótons aumentada, específica de células cancerígenas, que inicia um gradiente de pH e prótons invertido, aparece logo nos primeiros passos da transformação neoplásica. Tal acontece porque existe um aumento significativo da glicólise desde o primeiro momento, o que acompanha o aumento da atividade de NHEI. O aumento da sua expressão está muito associado à progressão e formação de novas metástases, assim como a sua inibição tem sido estudada como tratamento.<sup>(14)</sup>

### **3- Características do microambiente tumoral (TME)**

O microambiente que caracteriza as células cancerígenas, nomeadamente o seu pH desregulado, representa uma grande influência em vários processos ligados ao cancro.

No que diz respeito à proliferação e sobrevivência das células:

- Desde cedo se reconheceu que o pHi mais elevado era um sinal permissivo, mas não obrigatório, para o aumento da proliferação celular. Tal acontece porque, em células em interfase, o aumento de pHi no final da fase S do ciclo celular promove a transição G2/M. O perfil genético de linhas celulares de fibroblastos deu uma pista de como isto poderia acontecer: o pHi prolongadamente elevado aumenta os níveis de ciclina B1 e de fosfatase cdc25. Uma complexa cascata de reações, leva ao aumento de Cdk1 ativa, promovendo assim a entrada e transição G2/M.<sup>(8)(28)</sup>

- No caso da apoptose, a morte celular programada é desencadeada pela libertação de citocromo c pela mitocôndria, o qual irá ativar enzimas catabólicas, incluindo as caspases. A ativação de caspases mediada por citocromos requer acidificação citosólica, sendo que apresentam maior atividade entre pH 6,3-6,8. Uma vez que o pHi das células cancerígenas se encontra elevado, este processo pode ser bloqueado, não culminando na desejada morte celular.<sup>(8)</sup>

- Um pH mais elevado também confere uma vantagem adaptativa ao permitir que sejam ultrapassados os pontos de verificação/regulação que seriam realizados ao longo do ciclo celular, para certificar que durante a divisão não ocorreram danos graves, como ao nível do DNA, por exemplo.<sup>(21)</sup> Percebemos, desta forma, que a dinâmica de pHi desempenha um papel importante quer na proliferação celular e na apoptose, quer no aumento da instabilidade genética destas células, o que permite que as células se vão multiplicando indefinidamente.<sup>(8)(21)</sup>

Como todos os tecidos, os tumores também precisam obter os nutrientes necessários e eliminar os resíduos metabólicos produzidos através da corrente sanguínea. Por este motivo, a angiogénese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes,

está intimamente ligada à progressão do cancro. Evidências sugerem que as células do estroma no microambiente do tumor desempenham papéis críticos na ativação e manutenção da angiogénese crónica tumoral.<sup>(14)(31)</sup> Para além disso, indicam que o lactato produzido neste meio pode ser consumido pelas células endoteliais e estimular a angiogénese.<sup>(31)</sup> Ao contrário da vasculatura normal, a vascularização neoplásica ocorre de forma desordenada, resultando numa vascularização caótica e funcionalmente pobre, incapaz de atender às necessidades de oxigénio e nutrientes e permitir a eliminação de produtos metabólicos, o que vai contribuir para que o pHe seja ainda mais baixo.<sup>(11)(14)</sup> Entre os vários tipos de células estromais envolvidas neste processo, os TAMs (macrófagos associados a tumores) são um dos mais importantes.<sup>(31)</sup> No processo de progressão do tumor, uma das funções primárias das redes vasculares sanguínea e linfática é ajudar as células tumorais a escapar à vigilância imunitária.<sup>(9)</sup> Desta forma, podemos concluir que as células tumorais não só se conseguem adaptar a ambientes desfavoráveis, como são capazes de organizar as células estromais regionais de forma a que haja uma colaboração harmoniosa em seu favor.<sup>(31)</sup>

A metilação do DNA é uma modificação química na sua estrutura que pode levar à remodelação/transformação da cromatina, alterar a disponibilidade de genes e a sua expressão. Essa metilação pode influenciar o desempenho de diferentes áreas do DNA, como o promotor, o silenciador, o potenciador e RNAs não codificantes. Descobriu-se, recentemente, que o perfil de metilação do DNA pode estar envolvido na iniciação do microambiente tumoral e progressão do cancro. Um caso concreto são estudos feitos sobre o cancro da mama, em que se verificou que o promotor de genes chave se encontra hipometilado, como os da proteína MDRI (proteína que confere resistência a múltiplos fármacos), enquanto genes envolvidos na reparação de DNA, apoptose, controlo da proliferação e angiogénese estão hipermetilados.<sup>(28)</sup>

Numa análise pormenorizada ao nível do ambiente que caracteriza o tumor, os tumores sólidos contêm uma mistura complexa de vários tipos de células, onde se incluem as células cancerígenas e tecido estromal (células do sistema imunitário, fibroblastos, miofibroblastos, citocinas e tecido vascular) rodeado pela matriz extracelular.<sup>(7)(11)(31)</sup> Algumas destas células são responsáveis por libertar sinais promotores de crescimento e metabolitos intermediários, assim como remodelar a estrutura dos tecidos, de forma a construir o microambiente. A recíproca comunicação entre as células cancerígenas e este novo microambiente induz um aumento na capacidade de proliferação e formação de novas metástases.<sup>(31)</sup>

Todos estes aspetos em conjunto têm influência na forma como se dá a iniciação e como o cancro progride.

## 4- Influência do pH na formação de metástases

A invasão do tumor e formação de metástases, associadas com a progressão neoplásica, são a maior causa de morte devido a cancro.<sup>(14)(21)</sup> A aquisição de um fenótipo móvel e invasivo é um requisito para uma célula se tornar metastaticamente competente, e a capacidade de uma célula epitelial migrar individualmente é uma característica das células tumorigênicas.<sup>(30)</sup> Compreender os mecanismos que determinam a disseminação metastática de células malignas através da invasão de tecidos distantes é talvez a questão central em oncologia. No entanto, apesar de ser um aspeto relevante, em termos de terapia e sobrevivência permanece o aspeto menos estudado e conhecido.<sup>(14)</sup>

A formação de metástases envolve alterações na coordenação e regulação de vários processos celulares, nos quais se incluem: neoangiogénese, adesão celular (necessária para a fuga de células cancerígenas do tumor primário), degradação e remodelação da barreira da matriz extracelular (ECM), motilidade dirigida, sobrevivência na circulação e, por último, adaptação e crescimento ectópico no novo órgão invadido.<sup>(28)(30)(32)</sup>

A adaptação das células tumorais ao seu microambiente metabólico faz com que este seja uma força motriz fundamental na progressão do tumor para um fenótipo metastático mais agressivo, que é independente das alterações genómicas nas células que o constituem.<sup>(14)(30)</sup> A invasão ocorre através de uma série complexa de interações com os tecidos do hospedeiro, sendo que a infiltração e penetração do tecido normal ocorre em quatro passos bioquímicos e fisiológicos:

i) Perda de ligação das células tumorais às membranas basais ou ECM.

ii) Degradação direta das estruturas locais, dependente da expulsão de ácido das células tumorais.

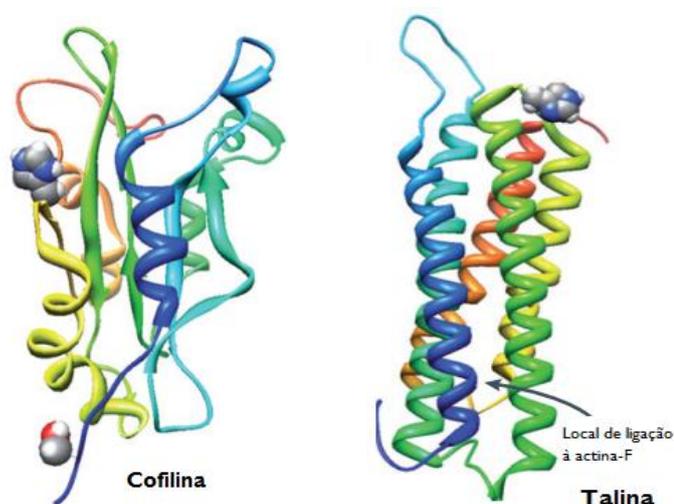
iii) Secreção de proteases dependentes, e ativadas, por acidez.

iv) Aumento da locomoção das células na região modificada.

Os passos ii), iii), e iv) são regulados pelo pHe e pHi.<sup>(14)(30)</sup> Um pHi aumentado e um pHe diminuído melhoram de forma coordenada a invasão e a metástase através de mecanismos complementares.<sup>(21)</sup> O microambiente tumoral, e em particular a sua acidez, tem-se revelado crítico no controlo da capacidade de invasão e conseqüente progressão maligna. Pode ser considerado um princípio estratégico utilizado pelo cancro, uma vez que apenas está a tirar partido de um efeito colateral do seu metabolismo.<sup>(14)</sup> Evidências revelam que sensores de pH controlam etapas distintas da migração celular, havendo especificidade na sinalização de pH e na capacidade do pH coordenar simultaneamente múltiplos processos envolvidos em comportamentos celulares complexos.<sup>(21)</sup>

O aumento do pHi é necessário para a migração dirigida das células, incluindo a remodelação de filamentos de actina e adesão de substratos celulares críticos para a células móveis, e por isso tem sido associado a fenótipos de invasão celular.<sup>(8)(21)</sup> Na migração de células normais, as mudanças na dinâmica de pHi permitem a remodelação da adesão citoesquelética e focal, uma vez que o aumento de pHi diminui a estabilidade das adesões focais e aumenta a taxa global de migração celular.<sup>(8)</sup>

Um dos principais sistemas sensíveis ao pH nas células é o citoesqueleto de actina. A montagem de estruturas globulares (actina-G) para filamentosas (actina-F), bem como o processo de desmontagem, conduzem a diferentes papéis nos processos e comportamentos das células cancerígenas. Esta montagem requer um pHi > 7,2 e alterações de 0,3-0,4 unidades induzem diferenças dramáticas na arquitetura dos filamentos de actina.<sup>(16)</sup> Isto deve-se ao facto da atividade das proteínas de ligação à actina serem dependentes de pH, como é o caso da cofilina e talina.<sup>(21)</sup> A cofilina é responsável pela desmontagem da rede de filamentos de actina em uma extremidade, deixando-a livre, o que permite a ligação à membrana plasmática.<sup>(8)(16)</sup> Por sua vez, o papel da talina na adesão focal passa por se ligar à actina-F, ligando os filamentos desta às aderências focais. Esta ligação diminui a um pH > 7,2, permitindo uma rotação mais rápida da adesão focal e um aumento da migração da célula.<sup>(8)(16)(21)</sup>



**Figura 4** - Estrutura de proteínas de ligação à actina, Cofilina e Talina, cuja atividade influencia a migração de células cancerígenas. (Adaptado de Webb B et al. (2011))<sup>(21)</sup>

A polaridade das células migratórias (que leva a um movimento polarizado) é dependente da atividade da GTPase CDC42 de baixo peso molecular e requer um aumento do pHi. Embora a GTPase CDC42 não seja diretamente regulada por alterações de pH, vários fatores trocadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que a estimulam estão ativos a pHi superior a

7,2.<sup>(16)(21)</sup> Além disso, o aumento do pH<sub>i</sub> foi proposto como necessário para a transição epitelial-mesenquimal, que está envolvida nos primeiros passos da metástase.<sup>(8)</sup>

Como já foi referido, os tumores sólidos podem ser altamente ácidos. Este baixo pH extracelular tem sido associado à transformação tumorigênica, rearranjos cromossômicos, desagregação da matriz extracelular, aumento da migração e invasão das células e indução de fatores de crescimento e proteases.<sup>(30)(33)</sup> A invasão é dependente da proteólise pericelular das barreiras da ECM. Essas barreiras impediriam a fuga de células tumorais da arquitetura tecidual normal e eventual passagem pelas paredes dos vasos sanguíneos. No entanto, o pH baixo do microambiente fornece um ambiente proteoliticamente ativo em volta do tumor.<sup>(30)</sup> É responsável pela atividade de proteases secretadas pelas próprias células do tumor e por células do microambiente estromal que o rodeiam.<sup>(14)</sup> Durante a invasão, as células cancerígenas usam catepsinas secretadas, intracelulares ou localizadas na superfície, serina proteases e metaloproteinases de matriz (MMPs) para clivar, remover e remodelar proteoliticamente diferentes tipos de substratos de ECM na superfície celular, incluindo colagénios e fibronectinas.<sup>(8)(14)</sup> Para além de aumentar a sua atividade, também é capaz de aumentar a sua produção e secreção, como é o caso das formas ativas de catepsina D, catepsina B, catepsina L, metaloproteinase 9 e 2 (MMP9 e MMP2) e da metaloproteinase ligada à membrana (MTI-MMP).<sup>(14)</sup> Embora algumas MMPs não estejam otimamente ativas em valores baixos de pHe, a sua conversão do estado latente para a forma ativa é dependente das atividades proteolíticas de outras famílias de proteases, que têm maior atividade em pH ácido, como é o caso da catepsina B.<sup>(21)(30)</sup> No caso das MMP3 e MMP9, valores mais baixos de pHe têm influência direta no aumento da sua atividade.<sup>(21)</sup> Para além da clivagem de proteínas, as proteases também são responsáveis pela degradação de glicosaminoglicanos.<sup>(30)</sup>

Como evidências do que foi acima exposto temos:

- i) O pH baixo demonstrou estimular a libertação de catepsina B e MMP9, presumivelmente através do aumento do volume lisossômico e a estimulação da migração lisossômica para a membrana celular, ambos observados em células cancerígenas invasivas.
- ii) Redução da capacidade invasiva da célula causada pelo aumento de pHe e pela incubação de células em ambiente com inibidores de várias proteases que são secretadas.
- iii) A função do NHE1 alterada diminui a atividade de MMP9, bem como a expressão do gene que o codifica.<sup>(30)</sup>

O NHE1 contribui significativamente no processo de degradação da matriz através da acidificação do meio extracelular, fornecendo as condições ideais para a atividade das enzimas, ou por efeitos na expressão e localização de MMPs.<sup>(8)(34)</sup> Foi identificado como sendo o

transportador envolvido na ativação, dependente de acidificação do pHe, da catepsina B, MMP-2, MMP-9 e o MTI-MMP.<sup>(14)</sup> Além disso, evidências recentes indicam que o NHE1 tem um papel importante na coordenação direta da motilidade das células tumorais e invasão independentemente das alterações no pHe. O estabelecimento de polaridade celular e movimento dirigido em uma célula invasiva requer uma remodelação dinâmica do citoesqueleto e uma redistribuição do NHE1 ativado para a ponta do compartimento do pseudópodes, estrutura envolvida na migração celular. Como prova da importância do NHE1 sabemos que a inibição farmacológica do NHE1 bloqueia a formação dessa estrutura invasiva e a capacidade de invadir.<sup>(29)(30)</sup>

O pHe ácido também mostrou aumentar a motilidade das células tumorais promovendo a formação de pseudópodes em células menos invasivas. Por sua vez, o pH baixo induz aumento do número e do comprimento desses pseudópodes. Tanto a protusão do pseudópodes quanto o comportamento migratório são reduzidos pelo aumento do pHe, que inibe a atividade de proteases secretadas e bloqueia a atividade do NHE1.<sup>(30)</sup>

Por último, o pHe diminuído aumenta a migração e invasão através do efluxo de iões e expulsão de H<sup>+</sup> que levam ao influxo obrigatório de água, resultando em inchaço osmótico e na abertura de canais de aquaporina. Esses efeitos aumentam a migração celular e a formação de bolhas na membrana, um importante processo no movimento amebóide de células altamente metastáticas.<sup>(21)</sup>

Um exemplo da ação direta do pH na metástase é o caso concreto do melanoma humano. As suas células migram mais rápido a um pHe de 7,0 em comparação com 7,4, que foi atribuído ao facto do pH regular a dinâmica das ligações integrina-ECM. Em causa não está a facto de afetar a afinidade da ligação da integrina às proteínas da ECM, mas sim a avidéz da integrina.<sup>(21)</sup>

Todos os processos apresentados, em conjunto, culminam na migração das células do tumor ao longo da ECM (adesão focal), e a extravasão e invasão através da ECM para os vasos sanguíneos (digestão focal), onde são transportadas e são capazes de metastizar noutras partes do corpo.<sup>(34)</sup>

Estes exemplos de proteínas e comportamentos celulares dependentes do pH revelam potenciais alvos terapêuticos e estratégias baseadas na utilização de alterações no pH para controlar a metástase das células tumorais. O potencial de modulação do pHe para reduzir a metástase de células tumorais foi demonstrado num teste no qual ao administrar oralmente bicarbonato a camundongos, aumentou-se tanto a capacidade tamponante sistémica quanto o pHe e inibiu metástases experimentais e espontâneas.<sup>(21)</sup>

## 5- Forma como o pH influencia respostas do sistema imunitário

Um outro componente importante em todo o processo de desenvolvimento do cancro é o sistema imunitário que tem três importantes funções: monitorizar a homeostase dos tecidos, proteger contra patogénicos invasores e eliminar as células danificadas. No caso concreto do cancro, o reconhecimento e eliminação das células tumorais nascentes é essencial.<sup>(9)</sup> O processo dinâmico de resposta imune no cancro pode ser dividido em três etapas: eliminação, equilíbrio e fuga. Essas três etapas também ilustram o papel do sistema imunitário na iniciação, progressão e invasão do cancro.<sup>(35)</sup>

Os tumores geralmente exibem grandes quantidades de heterogeneidade intratumoral em escalas genómicas, fisiológicas e anatómicas.<sup>(36)</sup> As suas células tumorais têm antigenicidade intrínseca, o que significa que elas não podem evitar ser reconhecidas por subgrupos específicos de células imunes, no entanto, aprendem muito rapidamente como escapar do reconhecimento imunitário através do desenvolvimento de mecanismos sofisticados que travam respostas imunitárias. Assim, não apenas sobrevivem em hospedeiros imunocompetentes, como também proliferam, progridem localmente e disseminam-se sistemicamente, superando as tentativas de defesa por parte do sistema imunitário. Uma das forças motrizes que tornam o microambiente tumoral (TME) um meio hostil para as células imunes antitumorais decorre da hipóxia e da cascata de reações bioquímicas que conduzem à acidez local, apontando para um efeito inibitório sobre algumas células de defesa do hospedeiro. Mesmo se os subgrupos de células imunes diversificadas forem diferencialmente sensíveis ao pH baixo e adotarem soluções heterogêneas para sobreviverem às condições ácidas, as disfunções metabólicas que caracterizam o local do tumor são, sem dúvida, um obstáculo para respostas imunes efetivas e um alvo atraente para a imunomodulação do cancro.<sup>(10)</sup> Até ao momento, muitos mecanismos responsáveis pela disfunção de células imunes no TME foram identificados. Alguns são mediados diretamente por fatores produzidos por tumores, enquanto outros resultam de alterações da homeostase normal do tecido que ocorrem na presença do cancro.<sup>(35)</sup>

As células cancerígenas sintetizam proteínas aberrantes que são apresentadas através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-I / II) e podem ser indutores potentes da vigilância imunitária. No entanto, sabe-se que os cancros inibem a função imunitária. A acidez poderá conduzir à fuga ao sistema imunitário, não apenas por cansaço de células efetoras antitumorais (por exemplo, Células T e Natural Killers (NK)), mas também

promovendo o recrutamento e a atividade de células imunes protumorais imunossupressoras, incluindo células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) e células T reguladoras (Tregs).<sup>(10)</sup> Num processo complexo e que envolve múltiplos passos, a morte de células tumorais por efetores inatos, particularmente células NK, ativa a resposta das células T CD8<sup>+</sup>. Mais detalhadamente, fagócitos residentes, incluindo células dendríticas (DCs), eliminam os detritos celulares contendo antígenos libertados no TME. As DCs migram, para os nódulos linfáticos, e apresentam os antígenos aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, preparando-os graças à adequada co-estimulação e citocinas que são fornecidas. A partir daqui, células T CD8<sup>+</sup> ativadas são levadas à expansão clonal e a entrar no sangue, para eventualmente se dirigirem ao local do tumor através de vias de adesão definidas. Após a ancoragem em células cancerígenas que expressam antígenos, essas mesmas células libertam grânulos citolíticos que causam a apoptose dos seus alvos.<sup>(10)</sup> Este processo, recentemente definido como "ciclo de imunidade do tumor", pode erradicar focos de tumores nascentes e contribui para a vigilância imunitária do cancro.<sup>(10)(35)</sup> No entanto, na maioria dos cancros, as células cancerígenas sobrevivem ao ataque do sistema imunitário e dão origem à estimulação imunitária crónica e ao início de uma complexa rede de disfunções imunes associadas, que são responsáveis por uma fuga imune adicional e progressiva. A persistência do antígeno tumoral força as células T a entrar em um estado imunitário bem definido, conhecido como "exaustão", no qual estas células perdem a maior parte de suas propriedades efetoras e sobrevivem em uma espécie de paralisia funcional.<sup>(10)</sup> Concomitantemente, como parte do processo fisiológico que controla a autoimunidade, Tregs, MDSCs, macrófagos e neutrófilos associados a tumores (TAMs e TANs, respetivamente) são recrutados para o local. Juntos, eles tentam controlar a superestimulação imune mas, involuntariamente, sustentam a progressão e a disseminação do tumor.<sup>(10)</sup>

## 5.1 - Células Natural Killers (NK)

As células NK são importantes células imunorreguladoras, que interagem com outras, como as células dendríticas, células T, macrófagos e células endoteliais através da secreção de citocinas, como IFN- $\gamma$ . São células efetoras que constituem a imunidade inata, sendo a primeira linha de defesa do sistema imunitário no controle do crescimento tumoral e progressão para metástase.<sup>(10)(35)</sup> As células NK circulantes estão na sua maioria em fase de repouso, mas a ativação por citocinas leva à infiltração tecidual. Uma vez reconhecido o alvo, a sua capacidade citotóxica pode culminar na apoptose de células tumorais.<sup>(10)</sup>

Similarmente a outras populações de células imunes, as células NK podem ser afetadas pelo metabolismo do tumor e seus produtos.<sup>(10)</sup> A sua função demonstrou ser regulada pelo

pH extracelular. Estas células têm uma ação antitumoral através da secreção de IFN- $\gamma$  e moléculas citotóxicas como a perforina e granzima.<sup>(37)</sup> Estudos, realizados *in vitro*, demonstraram que a libertação de perforina e granzima dos grânulos, a secreção de IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$  e a resposta citotóxica contra células tumorais foram marcadamente inibidas em valores baixos de pH, na faixa de 5,8 a 7,0. Inibição semelhante da função das células NK é induzida pelo ácido láctico. Além disso, um pH extracelular abaixo de 7,2 influenciou a sua ativação. Estas células parecem ser sensíveis ao aumento de lactato, que inibe a regulação positiva do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e, conseqüentemente, prejudica a sua função e sobrevivência. Curiosamente, a supressão da função das células NK por pH baixo mostrou estar associada à inibição da sinalização do alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), uma via crítica envolvida na ativação tanto de células T convencionais quanto de células NK.<sup>(38)</sup> De facto, a acidez tumoral é reconhecida por exercer um papel importante na facilitação da fuga do tumor proporcionada pelas células NK, diminuindo assim a atividade antitumoral destas.<sup>(10)</sup>

É importante notar que as alterações da atividade citotóxica pareciam ser de natureza permanente. As células NK cultivadas em primeiro lugar em pH baixo não se recuperaram após o tamponamento do meio de cultura, indicando um dano irreversível.<sup>(10)</sup>

A inibição da vigilância de tumores mediada por NK devido à acumulação de ácido láctico associado a lactato desidrogenase A (LDHA) foi recentemente demonstrada em imunocompetentes. Em ratos C57BL/6, nos quais tumores com a produção reduzida de ácido láctico apresentavam um desenvolvimento mais lento do que os tumores de controlo, mostraram um aumento da infiltração de células T e células NK produtoras de IFN- $\gamma$ , em relação ao controlo.<sup>(10)(38)</sup> Resultados semelhantes foram obtidos com um modelo de cancro pancreático, corroborando a evidência de que o lactato pode inibir a atividade das células NK *in vivo*. Adicionalmente, doentes com leucemia apresentaram defeitos tanto na interação de células NK com células tumorais, quanto na sua atividade citotóxica, e em doentes com cancro colorretal, as células NK exibiram profunda incapacidade de desgranular e produzir citocinas.<sup>(10)</sup> Um outro estudo demonstrou que a acidose tecidual compromete a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK, e que a alcalinização sistémica por administração oral de bicarbonato aumenta a produção de IFN- $\gamma$  e a infiltração de células NK no tecido tumoral, retardando o crescimento do tumor. Além disso, *in vitro*, comprovaram que o lactato inibe a citotoxicidade das células NK e que este efeito supressor foi amplificado quando os ensaios foram realizados em baixos valores de pH.<sup>(38)</sup> Embora não tenha sido diretamente demonstrado, pode-se

especular que muitos dos defeitos relatados da atividade das células NK em doentes com cancro poderiam ser, pelo menos em parte, atribuídos à acidez que caracteriza o TME.<sup>(10)</sup>

## 5.2 - Células dendríticas (DCs)

As DCs são células apresentadoras de antígenos altamente especializadas, com uma capacidade única de estimular células T em repouso, que induzem a ativação e regulação de respostas imunes antitumorais, desempenhando um papel importante na conexão da imunidade inata e adaptativa.<sup>(23)(36)(38)</sup> Elas são responsáveis pela indução de respostas imunes primárias, mas também desempenham um papel crítico na determinação do tipo de imunidade mediada por células T, bem como no silenciamento da resposta imune contra auto-antígenos. DCs não representam uma população celular homogênea; em vez disso, existem diferentes subconjuntos de DCs funcionalmente especializados, e cada um deles apresenta plasticidade fenotípica e funcional em resposta a diversos estímulos. A produção de DCs totalmente competentes envolve duas etapas principais: diferenciação de DCs de precursores do sangue e maturação em células fortes apresentadoras de antígenos. De fato, ao encontrar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a perigo (DAMPs) ou citocinas inflamatórias em tecidos periféricos, as DCs são ativadas e passam por um processo de maturação que leva a uma capacidade aumentada de ativar células T.<sup>(38)</sup>

Células dendríticas associadas ao tumor (TADCs) desempenham um papel ambíguo na progressão do cancro. Estas contribuem para a vigilância imunitária antitumoral, uma vez que podem apresentar antígenos tumorais e iniciar respostas específicas de células T antitumorais. A sua presença em tumores sólidos correlaciona-se positivamente com a sobrevivência prolongada do paciente, redução da incidência de metástases, atraso na progressão e um prognóstico favorável. No entanto, as DCs frequentemente exibem um fenótipo imaturo ou disfuncional. O TME pode alterar a diferenciação de precursores hematopoiéticos em DCs e prejudicar as funções de DCs em múltiplos níveis, inibindo a sua maturação e diferenciação ou induzindo DCs imunossupressoras.<sup>(10)</sup> Desta forma, há uma mudança metabólica das DCs de um fenótipo antitumorogénico para um fenótipo tolerogénico, caracterizado por baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, reduzida capacidade de apresentação de antígenos e reduzida capacidade de induzir respostas específicas das células T.<sup>(10)(39)</sup> Também foram descritos sub-conjuntos de DCs reguladores, que suprimem diretamente as respostas imunes antitumorais e promovem a expansão de Treg.<sup>(10)</sup>

A acidose extracelular mostrou-se capaz de modular tanto a diferenciação quanto a maturação das DCs. Estudos comprovam que a acidose láctica prejudica a diferenciação de

monócitos em DCs.<sup>(38)</sup> Os mesmos relataram que a diferenciação de DCs, em meio com ácido láctico, reduziu a expressão basal de CD1a, um marcador de DCs derivadas de monócitos, e mostram capacidade reduzida de produzir IL-12.<sup>(10)(38)</sup> Estes efeitos imunossupressores mediados pelo ácido láctico são dependentes do pH, uma vez que foram revertidos através da regulação do pH para valores neutros.<sup>(10)</sup>

Enquanto as DCs imaturas em repouso exploram a  $\beta$ -oxidação de lípidos e OxyPhos, durante a maturação e ativação trocam o seu metabolismo para glicólise aeróbica, gerando ácido láctico. Assim, é necessário que o lactato seja expulso através de MCTs, que podem ser bloqueados uma vez que existe elevada concentração de ácido láctico no exterior das DCs, prejudicando o seu metabolismo.<sup>(10)</sup>

### 5.3 - Células T

As células T são dos principais componentes celulares da resposta imune adaptativa aos neo-antígenos.<sup>(36)</sup> De acordo com os diferentes grupos de diferenciação, as células T são divididas em células CD4<sup>+</sup> T (células T auxiliares, Th) e células T CD8<sup>+</sup> (células T citotóxicas, Tc). Estes secretam IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17, que possuem efeitos antitumorais.<sup>(35)</sup>

Embora o sistema imunitário possa contar com um grande arsenal de componentes celulares e moleculares para combater o cancro, evidências clínicas e pré-clínicas apontam para as células T CD8<sup>+</sup> como elementos-chave na rejeição do tumor imunomediado. O início espontâneo de células T CD8<sup>+</sup> específicas, resultando na infiltração tumoral, é de facto um fator prognóstico positivo independente na maioria dos cancros sólidos. As células T CD8<sup>+</sup> reconhecem determinantes antigénicos de proteínas tumorais, com a sua expressão quantitativa ou qualitativamente alterada, como consequência da transformação neoplásica. Entre eles, um papel dominante está a ser atribuído aos chamados “neo-antígenos”, decorrentes de mutações não-sinónimas que ocorrem devido à instabilidade genética intrínseca das células cancerígenas.<sup>(10)</sup>

Uma vez reconhecido o antígeno, há libertação local de grânulos contendo perforina, que formam poros na membrana das células tumorais e causam desequilíbrio osmótico e apoptose, através de moléculas que danificam o DNA (por exemplo, granzima). A ativação de células T também está associada à expansão clonal e à produção de citocinas imunoestimulantes, cuja libertação é fundamental para sustentar a imunidade antitumoral e desenvolver memória imunitária a longo prazo.<sup>(10)</sup>

De forma similar aos tumores, as células T estimuladas exploram a glicólise aeróbica para manter a sua alta taxa proliferativa, aplicando assim o efeito de Warburg para manter os intermediários glicolíticos em níveis elevados em apoio às reações anabólicas ao

nível intracelular, o que lhes permite manter a sobrevivência e atividade.<sup>(10)(36)</sup> A glicólise elevada reduz significativamente a disponibilidade de glicose e, embora as células cancerígenas possam entrar em quiescência na ausência de glicose, as células T ativadas não sobrevivem sem esta. Assim, a glicose reduzida, sozinha, coloca as células T em desvantagem quando tentam expandir para um ambiente ácido.<sup>(36)</sup> As células T usam glicólise durante a ativação e exportam o lactato através do MCT-1. No entanto, tal como nas células dendríticas, a eliminação de lactato para o meio extracelular depende do gradiente entre as concentrações de ácido láctico citoplasmático e extracelular. Considerando que o MCTs co-transportam lactato e prótons seguindo o gradiente de concentração, a alta concentração de ácido láctico (lactato + prótons) que caracteriza o TME bloqueia o MCT-1, o que resulta no comprometimento da função de células T CD8<sup>+</sup>, como demonstrado pelo aumento da taxa de apoptose, redução da produção de IL-2, IFN- $\gamma$ , perforina e granzima.<sup>(10)(38)</sup>

Curiosamente, ácido láctico e HCl mostraram induzir diferentes padrões de supressão nas células T. De facto, o ácido láctico, mas não o HCl, suprimiu marcadamente a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 por células T CD8<sup>+</sup> estimuladas e também promoveu a morte celular. O forte efeito inibitório parece ser mediado, pelo menos em parte, via bloqueio do efluxo de lactato e, portanto, perturbação do metabolismo das células T.<sup>(38)</sup> Por sua vez, a acidificação induz um estado anérgico em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, resultando em reduções severas na atividade citolítica, secreção de citocinas, regulação negativa de IL-2Ra (CD25) e TCR (receptor de células T). Também foi relatado que o pH baixo afeta a mobilidade da membrana plasmática e dos microtúbulos, levando à diminuição da associação de diferentes componentes do TCR com CD8 ou outros co-receptores, contribuindo assim para a anergia das células T.<sup>(36)(38)</sup>

Um pH tão baixo quanto 6,6 levou à diminuição da ativação e proliferação, bem como diminuição da secreção de citocinas e progressão do ciclo celular. No entanto, uma ativação mais forte das células T, por exemplo, ao utilizar o sinal CD28 co-estimulatório, restaurou a função completa, indicando que a acidez pode aumentar o limite de ativação nas células T.<sup>(10)</sup> Por último, células T são altamente dependentes da atividade do mTORC1 para lidar com seus requisitos metabólicos para ativação e diferenciação. O pH baixo inibe a atividade da mTORC1 em linhas celulares humanas para além de suprimir acentuadamente a atividade do mTORC1 em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.<sup>(38)</sup>

Demonstrou-se, *in vitro*, que o aumento do pH da cultura pode reverter a anergia das células T e que a exposição a longo prazo ao pH baixo pode causar danos permanentes ou induzir a apoptose das células T.<sup>(36)(38)</sup> Por outro lado, a reversão da acidez pelo bicarbonato parece estar associada à normalização da vasculatura tumoral, o que obviamente contribuiria

para melhorar o retorno das células T ao local do tumor.<sup>(10)</sup> É digno de nota que o aumento do pH intratumoral com bicarbonato de sódio oral num modelo de camundongo aumentou as respostas antitumorais de células T. Para concluir, a supressão da função das células T pelo ácido láctico mostrou ser um fenômeno reversível após um período de recuperação de 24 horas em meio isento de ácido láctico.<sup>(38)</sup>

#### **5.4 - Células T reguladoras (Tregs)**

Vários mecanismos de fuga têm sido estudados, e um dos que parece estar omnipresente em todos os cânceros e claramente associado à progressão da doença é a acumulação de células Treg.<sup>(35)</sup> O seu estado de ativação e frequência têm sido associados a um mau prognóstico em doentes com cancro.<sup>(10)(35)</sup> Em condições fisiológicas normais, Treg têm um papel benéfico na prevenção da autoimunidade.<sup>(35)</sup> No entanto, o ambiente metabólico, hipóxico e com poucos nutrientes, revela-se prejudicial para a ativação e expansão das respostas antitumorais das células T enquanto é permissivo para o acúmulo de células imunossupressoras como as Tregs. Acumuladas no TME, desempenham um papel crucial no amortecimento da resposta antitumoral.<sup>(10)</sup> Elas expandem-se, migram para locais tumorais e suprimem as respostas antitumorais das células T.<sup>(35)</sup> Estudos recentes demonstram claramente que as Tregs infiltrantes tumorais exibem assinaturas transcricionais únicas, as quais, além de testemunharem um estado avançado de ativação, também indicam que os Tregs expressam uma grande variedade de recetores de quimiocinas. A hipóxia e a acidez aumentam a expressão intratumoral de quimiocinas e, assim, facilitam o recrutamento ativo de Tregs que expressam os recetores correspondentes.<sup>(10)</sup>

O TME ácido pode afetar a homeostase de Treg e potencializar suas funções supressoras. Uma nova visão de comunicação célula-a-célula está a emergir e, nessa rede funcional, um papel proeminente é desempenhado pelos exossomas nas sinapses. Um estudo indica que os exossomas de Treg e o seu conteúdo específico de miRNA contribuem para a supressão da proliferação e atividade das células T convencionais mediada por Treg. Em vários tipos de células, especialmente em células tumorais, a libertação de exossomas é fortemente aumentada pela hipóxia e pelo ambiente ácido. Assim, é razoável especular que estes dois fatores, induzidos pelo tumor, aumentam a libertação de exossomas de Treg, fornecendo um possível mecanismo adicional para melhorar a imunossupressão.<sup>(10)</sup>

Evidência acumulada indica que Tregs possuem requisitos metabólicos em conformidade com a baixa disponibilidade de glicose, garantindo a sua diferenciação e a sobrevivência. Este tipo de células enfrenta essas condições extremas, obtendo energia através da OxyPhos. Para o seu suprimento de energia, os Tregs podem explorar fontes de combustível alternativas à

glicose e, portanto, provavelmente não são afetados pela competição da glicose que ocorre no local do tumor.<sup>(10)</sup> No entanto, os resíduos metabólicos das vias glicolíticas, como o lactato, promovem, de fato, a atividade das Tregs.

Em conclusão, o microambiente tumoral possui fatores que contribuem sinergicamente para um ambiente Treg vantajoso em doentes com cancro. De fato, uma análise proteômica demonstra que as Tregs isoladas de locais tumorais têm um perfil diferente das Tregs sanguíneas periféricas, que são altamente glicolíticas e anérgicas, fornecendo provas de que ocorreu uma reprogramação metabólica, enfatizando a plasticidade e a sua capacidade superior de adaptação às condições dirigidas por tumores, permitindo a sua adaptação.<sup>(10)</sup>

## **5.5 - Células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs)**

As células mielóides são uma população altamente heterogênea, dividindo-se em células mielóides mononucleares e células mielóides granulocíticas. As primeiras consistem principalmente em monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs), podendo os monócitos diferenciar-se em macrófagos e DCs sob algumas condições inflamatórias.<sup>(40)</sup> Doentes com diferentes histologias de cancro geralmente apresentam acúmulo patológico de células mielóides aberrantes no sangue.<sup>(10)(35)(40)</sup> Esse fenômeno decorre do condicionamento da mielopoiese da medula óssea por fatores sistêmicos produzidos pelas células tumorais, que provoca uma mobilização de células imaturas. As MDSCs estão entre os reguladores negativos mais potentes da imunidade adaptativa e inata, e o seu acúmulo está associado à imunossupressão e à agressividade do cancro.<sup>(10)</sup> Quando atraídas por citocinas e quimicinas do ambiente tumoral, as MDSCs podem participar diretamente na formação de nichos pré-metastáticos e promover a metástase de células tumorais por infiltração de tumores primários, e promover a angiogênese tumoral por secretar citocinas, MMP9 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Por outro lado, podem inibir a função imunitária, inibindo a ativação de células T e NK, para acelerar a progressão do tumor.<sup>(10)(40)</sup> Graças à sua plasticidade funcional intrínseca, as células mielóides podem detetar com sensibilidade as mudanças no pH local e responder prontamente moldando o seu status e diferenciação. Está bem estabelecido que a acidez que caracteriza locais inflamatórios, incluindo o cancro, é um grande “atrator” das células mielóides. Para além das MDSCs, o baixo pH ambiental também é responsável pela indução direta de uma série de mediadores pró-inflamatórios em várias células mielóides associadas a tumores.<sup>(10)</sup>

Os macrófagos alteram o perfil de expressão da sua superfície celular à medida que se polarizam, em resposta ao meio externo, entre os fenótipos anti-inflamatório (M1) e pró-inflamatório (M2), contribuindo para a imunorregulação. Os macrófagos M1 'ativados

classicamente' podem ativar as células T e apresentar atividade citotóxica. Macrófagos M2 'ativados alternativamente' expressam ligantes imunossupressores.<sup>(36)(38)(41)</sup> O ácido láctico e baixo pH induzem a sua polarização no tipo M2.<sup>(10)(42)</sup>

A isoforma induzível da sintetase de óxido nítrico (iNOS) é significativamente aumentada em macrófagos expostos a valores de pH abaixo de 7,0. Como o óxido nítrico (NO) prejudica a recuperação do pH intracelular em macrófagos após a carga ácida, este circuito de amplificação tende a manter automaticamente o efeito pró-inflamatório da acidez da TME.<sup>(10)</sup>

## **6- Implicações do pH desregulado no tratamento do cancro**

Cirurgia, radioterapia e quimioterapia são as abordagens convencionais utilizadas no tratamento do cancro. A cirurgia foi a primeira modalidade utilizada com sucesso e, em muitos tumores sólidos comuns, a única terapia que proporciona a cura. Um dos maiores obstáculos para a alcançar, na maioria dos cancros, não é a remoção do tumor primário, mas sim a eliminação de metástases. Por sua vez, a quimioterapia é a administração de agentes citotóxicos (oralmente ou por via intravenosa, geralmente em combinação) resultando em citotoxicidade para as células em repouso e em divisão. O objetivo da quimioterapia é evitar que as células cancerígenas se multipliquem, invadam e formem metástases, culminando na morte do paciente. A radioterapia, é usada para tratamento local.<sup>(6)(22)</sup> Outras técnicas convencionais utilizadas, incluem transplante de medula óssea, transplante de células-tronco periféricas, terapia hormonal, terapia fotodinâmica, imunoterapia e terapia genética.<sup>(6)</sup>

Um pH<sub>i</sub> patologicamente elevado e o gradiente de prótons a ele associada talvez possa ser considerado a anormalidade do cancro mais específica e a marca essencial de todos os tipos de células e tecidos malignos, apresentando-se, ao mesmo tempo, como um desafio e oportunidade para a descoberta de novos fármacos.<sup>(12)(21)</sup> Estudos referem que o pH desregulado contribui para a resistência à quimioterapia, radioterapia e imunoterapia.<sup>(8)(17)</sup> Este tem um efeito sobre a ação dos fármacos porque a maioria possui pelo menos um grupo com pH titulável. Muitos dos fármacos utilizados têm alvos intracelulares e são bases fracas que são protonadas (carregadas positivamente) em pH mais baixo e neutras a pH mais elevado.<sup>(21)</sup> As protonações variáveis podem afetar a distribuição do fármaco entre os espaços extracelular e intracelular, uma vez que o fármaco protonado é sequestrado nos locais onde o ambiente é ácido, isto é, ambiente extracelular.<sup>(21)(42)</sup> Do ponto de vista terapêutico, o objetivo primário numa abordagem baseada no pH para o tratamento do cancro é manipular as forças seletivas que controlam a dinâmica desregulada do pH, de todas as células e tecidos cancerígenos, de

forma a regredir o crescimento do tumor, controlar a invasão local e desativar potenciais metástases.<sup>(12)</sup> Olhando para o futuro, várias estratégias inovadoras de administração de medicamentos têm sido desenvolvidas para explorar o baixo pH<sub>e</sub> dos tumores e permitir a entrega de fármacos específicos no local, incluindo nanogéis, polimersomas e micelas, possibilitando desta forma contornar efeitos secundários indesejáveis em tecidos normais.<sup>(17)(21)</sup> Tais estratégias podem ajudar a melhorar a eficácia dos medicamentos existentes. No entanto, a compreensão como um aumento do pH<sub>i</sub> e um pH<sub>e</sub> diminuído facilitam a proliferação, sobrevivência e invasão pode levar a novos alvos para a terapia que pode ser eficaz em várias classes de cancro.<sup>(21)(28)</sup>

É um facto bem definido que a imunoterapia é uma das abordagens mais eficazes para a terapia do cancro.<sup>(17)</sup> É um campo crescente e promissor que pode levar a um melhor controlo de cancros com altas cargas mutacionais (neo-antígenos).<sup>(36)</sup> Entretanto, a terapia direcionada para o cancro pode apresentar melhores resultados clínicos se a desregulação do pH for inibida. Todos os eventos anormais, que caracterizam os tumores, fazem com que o TME seja exposto a um cocktail de várias enzimas com pH ácido, sobre os quais a ECM pode ser remodelada e até mesmo deformada, resultando num TME viscoso, com alta pressão do fluido intersticial, que também atua como um obstáculo à terapia.<sup>(17)</sup> No entanto, este tipo de terapia está em constante evolução, e anticorpos dirigidos a reguladores de pH e compostos capazes de modular a sua função foram desenvolvidos e estão atualmente em várias fases de desenvolvimento clínico.<sup>(38)</sup>

Para estudarmos potenciais tratamentos, é essencial percebermos os mecanismos pH dependentes envolvidos nos processos que ocorrem no tumor.<sup>(30)</sup> Como já foi referido, o gradiente de pH reverso é mantido pelo aumento da expressão e/ou atividade de vários transportadores de membrana plasmática e proteínas de efluxo ácido. A rutura da homeostase do pH pela inibição desses transportadores e trocadores tem sido sugerida como uma estratégia terapêutica, estando alguns desses inibidores em testes clínicos.<sup>(14)(42)(43)(44)</sup> Vários grupos demonstraram que a redução do pH<sub>i</sub> pela supressão da expressão de transportadores de iões ou o uso de inibidores seletivos de transportadores de iões é suficiente para sensibilizar uma linhagem quimiorresistente. Também é sabido que qualquer tentativa de induzir de forma terapêutica a acidificação intracelular seletiva como um tratamento antiglicolítico aumentaria secundariamente o pH tumoral intersticial, inibindo assim o processo metastático. Isto representa uma abordagem racional e firme ao tratamento do cancro em todos os seus estados de desenvolvimento.<sup>(12)(28)</sup> Estes resultados promissores e a variedade de linhas celulares, tipos de tumores e modelos animais nos quais a inibição dos

transportadores de iões foi bem sucedida, sugerem que as aplicações clínicas são mais geralmente aplicáveis do que outras terapias alvo, ou seja, tem o potencial de ser seletivamente explorado no tratamento de vários tipos de cancro.<sup>(8)(12)(28)</sup> Assim sendo, o próximo passo para a terapia parece ser a combinação de inibidores específicos de bioelementos envolvidos na desregulação do pH em conjunto com agentes anticancerígenos convencionais.<sup>(17)(28)</sup> Demonstrou-se que o uso desses inibidores em combinação com inibidores antiangiogénicos poderia efetivamente suprimir os tumores sólidos. Uma vantagem dessa modalidade de tratamento parece ser a indução de menor toxicidade em comparação com as estratégias tradicionais de quimioterapia. Desta forma, obtemos melhores resultados no tratamento do tumor e metástases, ao mesmo tempo que neutralizamos resistências a fármacos, obtendo uma maior sensibilização das células aos tratamentos.<sup>(28)</sup>

Devido à importância do NHEI em numerosos processos fisiológicos e fisiopatológicos, associados ao aumento da malignidade do tumor, e seu potencial terapêutico extremamente elevado no bloqueio da progressão tumoral, vários inibidores foram desenvolvidos.<sup>(14)</sup> Cariporide, potente inibidor de NHEI, por exemplo, tem potencial como agente anticancerígeno altamente promissor, minimamente tóxico e realmente eficaz em uma ampla gama de tumores malignos e leucemias, representando um novo paradigma na terapia contra o cancro.<sup>(12)(42)</sup> Para além disso, tanto o cariporide como outros inibidores de NHEI, têm muito pouco efeito em tecidos normais, devendo ser uma vantagem a considerar e explorar como importante grau de especificidade no efeito anticancerígeno.<sup>(12)</sup>

Também é possível utilizar uma abordagem mais direta para neutralizar a acidez, através da administração de um tampão oral, como  $\text{NaHCO}_3$ .<sup>(42)(45)</sup> A especificidade para os tumores resulta do facto de que o pH do tumor ser ácido e não regulado, enquanto o pH sistémico é alcalino e altamente regulado. Portanto, os tampões agem para que o pH do tumor seja consistente com o do resto do corpo.<sup>(42)</sup> Como já foi referido, o pH extracelular ácido é responsável pelo efeito inibitório sobre algumas células do sistema imunitário. Foram observadas melhorias substanciais para estratégias imunoterapêuticas promissoras associadas a terapia com bicarbonato, onde o tamponamento em combinação com imunoterapia conduziu a melhores resultados e mais duradouros.<sup>(36)(46)</sup> Também a alcalinização crónica do tumor reduziu metástases espontâneas e experimentais em camundongos com cancro humano da mama e da próstata. Estes efeitos não foram generalizados, no entanto modelos de difusão reativa predizem que outros tampões com maior pKa devem ser mais eficazes.<sup>(33)</sup> A terapia com bicarbonato também está a ser considerada para uso no mTORC I, o principal regulador da proliferação celular. A atividade do mTORC I diminui durante a acidose e foi recentemente

demonstrado que as células perdem a sensibilidade à prevenção da proliferação pela rapamicina (inibidor da mTORC1). Em experiências realizadas *in vivo* (xenoenxertos/aloenxertos), a terapia com bicarbonato melhorou substancialmente a eficácia do tratamento com rapamicina.<sup>(46)</sup> Em adição, a neutralização da acidose tumoral pela administração de tampões sistêmicos, tem demonstrado dificultar o crescimento do tumor em modelos experimentais.<sup>(38)</sup>

Em conclusão, controlando a dinâmica desregulada do pH de tecidos cancerígenos podemos controlar a evolução do tumor e seu tratamento. Todas as evidências disponíveis parecem indicar que isso ocorreria independentemente de diferenças patológicas, tipo de tecido ou origem genética. Essa abordagem terapêutica também induziria muito menos toxicidade do que os tratamentos atuais, provavelmente também terapias mais eficazes, e tem possibilidade de se tornar uma estratégia bem sucedida no tratamento do cancro humano em geral.<sup>(12)</sup>

## 7- Conclusão

Tumores sólidos exibem marcas complexas. Embora o pH seja o principal parâmetro para a homeostase celular, infelizmente, este está desregulado nas células cancerígenas e no ambiente que as envolve.<sup>(28)</sup> Através da informação acima exposta, podemos concluir que o facto do pH se encontrar desregulado, provoca uma série de alterações em funções intrínsecas em vários tipos de células, que desencadeiam a progressão e invasão de tumores sólidos, tendo um forte impacto no desenvolvimento do cancro.<sup>(17)</sup>

Nos dias de hoje, o cancro é uma doença complexa, para a qual existem tratamentos, mas nem todos alcançam a desejada cura. Para que isso ocorra, é cada vez mais importante individualizar a terapia utilizada. Neste campo, é imperativo continuar a estudar a doença e as suas características, para desta forma perceber onde nos podemos focar para desenvolver novas terapias ou melhorar as já existentes, diminuindo as vantagens das células tumorais ou explorando as suas vulnerabilidades.<sup>(10)</sup>

O tratamento utilizando novas abordagens terapêuticas, e/ou combinado com tratamentos convencionais, pode ser a chave para uma terapia mais eficaz e com menos efeitos tóxicos para o organismo do doente. Desta forma, pode ter um importante papel na diminuição do número de mortes associada ao cancro e na melhoria da qualidade de vida dos portadores da doença.

## Referências Bibliográficas

- (1) LIGA PORTUGUESA CONTRA O CANCRO - **O que é o cancro?** [Acedido a 19 de agosto de 2019]. Disponível em: <https://www.ligacontracancro.pt/o-que-e-o-cancro/>
- (2) BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R., TORRE, L. e JEMAL, A. - **Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** CA A Cancer Journal for Clinicians, 68:6 (2018) 394-424.
- (3) FERLAY, J., COLOMBET, M., SOERJOMATARAM, I., DYBA, T., RANDI, G., BETTIO, M., GAVIN, A., VISSER, O. e BRAY, F. - **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018.** European Journal of Cancer, 103 (2018) 356-387.
- (4) GLOBAL CANCER OBSERVATORY - **Cancer Today.** [Acedido a 19 de agosto de 2019]. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=5&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&projection=natural-earth&color\\_palette=default&map\\_scale=quantile&map\\_nb\\_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D)
- (5) GLOBAL CANCER OBSERVATORY - **Cancer Today.** [Acedido a 19 de agosto de 2019]. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age\\_group=value&apc\\_male=0&apc\\_female=0](https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0)
- (6) ROY, P.S. e SAIKIA, B.J. - **Cancer and cure: A critical analysis.** Indian Journal of Cancer, 53:3 (2016) 441-442.
- (7) WEBER, C.E. e KUO, P.C. - **The tumor microenvironment.** Surgical Oncology, 21:3 (2012) 172-177.
- (8) WHITE, K., GRILLO-HILL, B. e BARBER, D. - **Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance.** Journal of Cell Science, 130:4 (2017) 663-669.
- (9) WANG, M., ZHAO, J., ZHANG, L., WEI, F., LIAN, Y., WU, Y., GONG, Z., ZHANG, S., ZHOU, J., CAO, K., LI, X., XIONG, W., LI, G., ZENG, Z. e GUO, C. - **Role of tumor microenvironment in tumorigenesis.** Journal of Cancer, 8:5 (2017) 761-773.

- (10) HUBER, V., CAMISASCHI, C., BERZI, A., FERRO, S., LUGINI, L., TRIULZI, T., TUCCITTO, A., TAGLIABUE, E., CASTELLI, C. e RIVOLTINI, L. - **Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation.** *Seminars in Cancer Biology*, 43 (2017) 74–89.
- (11) HIRATA, E. e SAHAI, E. - **Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7:7 (2017).
- (12) ALFAROUK, K., VERDUZCO, D., RAUCH, C., MUDDATHIR, A., BASHIR, A., ELHASSAN, G., IBRAHIM, M., OROZCO, J., CARDONE, R., RESHKIN, S. e HARGUINDEY, S. - **Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question.** *Oncoscience*, 1:12 (2014) 777-802.
- (13) LU, J., TAN, M. e CAI, Q. - **The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism.** *Cancer Lett*, 356:2 (2015) 156-164.
- (14) RESHKIN, S.J., CARDONE, R.A. e HARGUINDEY, S. - **Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchanger, pH Regulation and Cancer.** *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8, N°1 (2013) 85-99.
- (15) VANDER HEIDEN, M.G., CANTLEY, L.C. e THOMPSON, C.B. - **Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.** *Science*, 324:5930 (2009) 1029-1033.
- (16) DAMAGHI, M., WOJTKOWIAK, J. e GILLIES, R. - **pH sensing and regulation in cancer.** *Frontiers in Physiology*, 4 (2013).
- (17) BARAR, J. and OMIDI, Y. - **Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy.** *BiolImpacts*, 3:4 (2013) 149-162.
- (18) ZHENG, J. - **Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review).** *Oncology Lett*, 4:6 (2012) 1151-1157.
- (19) EPSTEIN, T., GATENBY, R.A. e BROWN, J.S. - **The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand.** *Plos One*, 12:9 (2017).
- (20) LIBERTI, M.V. e LOCASALE, J.W. - **The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?** *Trends in Biochemical Sciences*, 41:3 (2016) 211-218.

- (21) WEBB, B., CHIMENTI, M., JACOBSON, M. e BARBER, D. - **Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression.** Nature Reviews. Cancer, 11:9 (2011) 671–677.
- (22) BALAMURUGAN, K. - **HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer.** International Journal of Cancer, 138:5 (2016) 1058-1066.
- (23) NAKAZAWA, M., KEITH, B. e SIMON, M.C. - **Oxygen Availability and Metabolic Adaptations.** Nature reviews. Cancer, 16:10 (2016) 663-673.
- (24) KOPPENOL, W.H., BOUNDS, P.L. e DANG, C.V. - **Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism.** Nature Reviews. Cancer, 11 (2011) 325-337.
- (25) LIM, H.Y., HO, Q.S., LOW, J., CHOOLANI, M. e WONG, K.P. - **Respiratory competent mitochondria in human ovarian and peritoneal cancer.** Mitochondrion 11:3 (2011) 437-443.
- (26) SCOTT, D.A., RICHARDSON, A.D., FILIPP, F.V., KNUTZEN, C.A., CHIANG, G.G., RONAI, Z.A., OSTERMAN, A.L. e SMITH, J.W. - **Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect.** The Journal of Biological Chemistry, 286:49 (2011) 42626-42634.
- (27) SMOLKOVÁ, K., PLECITÁ-HLAVATÁ, L., BELLANCE, N., BENARD, G., ROSSIGNOL, R. e JEŽEK, P. - **Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 43 (2011) 950-968.
- (28) ASGHARZADEH, M., BARAR, J., POURSEIF, M., ESKANDANI, M., NIYA, M. e AND OMIDI, Y. - **Molecular machineries of pH dysregulation in tumor microenvironment: potential targets for cancer therapy.** Bioimpacts, 7:2 (2017) 115-133.
- (29) XIE, R., WANG, H., JIN, H., WEN, G., TUO, B. e XU, J. - **NHE1 is upregulated in gastric cancer and regulates gastric cancer cell proliferation, migration and invasion.** Oncology Reports, 37:3 (2017) 1451-1460.
- (30) CARDONE, R., CASAVOLA, V. e RESHKIN, S. - **The role of disturbed pH dynamics and the  $NA^+/H^+$  exchanger in metastasis.** Nature Reviews. Cancer, 5:10 (2005) 786-795.
- (31) YUAN, Y., JIANG, Y.C., SUN, C.K. e CHEN, Q.M. - **Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review).** Oncology Reports, 35:5 (2016) 2499-515.

- (32) JANSSEN, L.M.E., RAMSAY, E.E., LOGSDON, C.D. e OVERWIJK, W.W. - **The immune system in cancer metastasis: friend or foe?** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5:1 (2017).
- (33) HASHIM, A.I., ZHANG, X., WOJTKOWIAK, J.W., MARTINEZ, G.V. e GILLIES, R.J. - **Imaging pH and Metastasis.** *NMR Biomed*, 24:6 (2011) 582-591.
- (34) AMITH, S.R., FONG, S., BAKSH, S. e FLIEGEL, L. - **Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in the tumour microenvironment: does NHE1 drive breast cancer carcinogenesis?** *The International Journal of Developmental Biology*, 59:7-9 (2015) 367-77.
- (35) WHITESIDE, T.L. - **The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth.** *Oncogene*, 27:45 (2008) 5904-5912.
- (36) DAMGACI, S., IBRAHIM-HASHIM, A., ENRIQUEZ-NAVAS, P.M., PILON-THOMAS, S., GUVENIS, A. e GILLIES, R.J. - **Hypoxia and acidosis: immune suppressors and therapeutic targets.** *Immunology*, 154:3 (2018) 354-362.
- (37) LI, Y., WAN, Y.Y. e ZHU, B. - **Immune Cell Metabolism in Tumor Microenvironment.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1011 (2017) 163-196.
- (38) ERRA DÍAZ, F., DANTAS, E. e GEFFNER, J. - **Unravelling the Interplay between Extracellular Acidosis and Immune Cells.** *Mediators of Inflammation*, (2018).
- (39) WU, D. - **Innate and Adaptive Immune Cell Metabolism in Tumor Microenvironment.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1011 (2017) 211-223.
- (40) YIN, Z., LI, C., WANG, J. e XUE, L. - **Myeloid-derived suppressor cells: Roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy.** *International Journal of Cancer*, 144:5 (2019) 933-946.
- (41) LI, Y. e ZHU, B. - **Editorial: Metabolism of Cancer Cells and Immune Cells in the Tumor Microenvironment.** *Frontiers in Immunology*, 9 (2018).
- (42) PILLAI, S.R., DAMAGHI, M., MARUNAKA, Y., SPUGNINI, E.P., FAIS, S. e GILLIES, R.J. - **Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis.** *Cancer Metastasis Reviews*, 38:1-2 (2019) 205-222.
- (43) PERSI, E., DURAN-FRIGOLA, M., DAMAGHI, M., ROUSH, W.R., ALOY, P., CLEVELAND, J.L., GILLIES, R.J. e RUPPIN, E.- **Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy.** *Nature Communications*, 9:1 (2018) 2997.

- (44) HARDONNIÈRE, K., HUC, L., SERGENT, O., HOLME, J.A. e LAGADIC-GOSSMANN, D. - **Environmental carcinogenesis and pH homeostasis: Not only a matter of dysregulated metabolism.** *Seminars in Cancer Biology*, 43 (2017) 49-65.
- (45) SCHWALFENBERG, G. - **The Alkaline Diet: Is There Evidence That an Alkaline pH Diet Benefits Health?** *Journal of Environmental and Public Health* (2012).
- (46) PARKS, S.K. e POUYSSÉGUR, J. - **Targeting pH regulating proteins for cancer therapy-Progress and limitations.** *Seminars in Cancer Biology*, 43 (2017) 66-73.