



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Jorge Miguel da Silva Bacelar

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Anticancer oxysterols”
referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação,
respetivamente, da Dra. Ana Sofia Lopes Baptista e da Professora
Doutora Maria Manuel Cruz Silva apresentados à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação
de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2018

Jorge Miguel da Silva Bacelar

Relatório de estágio e Monografia intitulada “Anticancer oxysterols”, sob a orientação, respetivamente, da Dr.^a Ana Sofia Lopes Baptista e da Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018

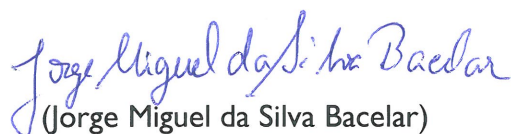
UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Eu, Jorge Miguel da Silva Bacelar, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º de estudante 2013132994, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Anticancer oxysterols” 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, 6 de setembro de 2018.


(Jorge Miguel da Silva Bacelar)

“Seduto in sala di attesa
con una cuffia verde in testa
in *pendant* con il copriscarpa –
mentre la dottoressa
si prepara all’operazione –
elaboro l’universo
com procedure standard
sia di non senso che di logica
per trovare una soluzione
all’esistenza.”

Roberto Maggiani, *in Angoli Interni*

Agradecimentos

They say “it takes a village to raise a child”, e este provérbio, tomou os contornos da realidade nos últimos 5 anos. Esta passagem por Coimbra, e a realização do MICEF, trouxeram-me um grande sentido de realização pessoal, e culminou no crescimento do rapaz que aqui chegou, e hoje parte um homem formado, com mais vivência, uma identidade pessoal clara, e orgulho do que foi capaz de alcançar. Mas nada disto seria possível sem a minha “village”, as pessoas que fizeram parte deste percurso, lhe deram o seu significado e encheram a minha vida de emoção. Como tal, sinto-me levado a fazer-lhes os mais merecidos agradecimentos.

À minha orientadora da Monografia, a Professora Doutora Maria Manuel Silva, agradeço o entusiasmo com que me recebeu enquanto seu orientando, tendo sido um exemplo do que um professor deve ser para os seus alunos, através do seu brio e profissionalismo, sem nunca se distanciar de nós na parte humana, evidente pelas várias conversas, conselhos e orientação que me deu.

À minha orientadora do Estágio Curricular em Farmácia Comunitária, a Dr.^a Ana Baptista, por todos os ensinamentos transmitidos, acessibilidade e o gosto com que me recebeu na Farmácia Santa Isabel.

À minha família, em particular ao meu irmão, pelo confidente e porto seguro que tem sido, e aos meus pais, que são a razão pela qual pude ter esta experiência, por todo o seu apoio e por serem exemplos de o que um trabalhador árduo e honesto é capaz de atingir. Por nunca me cortarem as pernas e sempre me incentivarem a voar mais alto, com a certeza de que estão sempre a meu lado para me encorajar.

À Maria Inês e à Bianca, que nesta fase final tanto me apoiaram com a sua boa disposição e ouvido amigo, ajudando a apaziguar todas as preocupações e a seguir em frente.

À Anita, que adicionou uma nova melodia ao final desta grande história.

À Carla, por ser a fonte sarcasmo que tanto me faz rir.

Ao Filipe, pela sua amizade, por me ajudar a descobrir o meu valor, por acreditar sempre nas minhas capacidades, mesmo quando eu duvidei.

Ao Kevin e à Joana, as joias deste percurso. A vossa amizade está por detrás da minha saudade por esta Cidade. Obrigado por acreditarem sempre em mim, celebrarem as minhas vitórias e me ajudarem a levantar das derrotas.

Por fim, a Coimbra, a cidade que de tudo isto é feita, e que guardo com carinho no coração, para sempre.

Muito obrigado a todos!

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária.....	9
Resumo	9
Abstract	9
Abreviaturas.....	10
1. Introdução.....	11
2. Análise do Estágio	11
2.1. Pontos Fortes	12
2.1.1. Sistematização de tarefas.....	12
2.1.2. Realização prévia de um Estágio de Verão em Farmácia Comunitária	13
2.1.3 Conhecimento adquirido ao longo do MICF	13
2.1.4. Atendimento de utentes ao balcão	13
2.1.5. Atendimento de utentes estrangeiros.....	14
2.1.6. Medicamentos Manipulados.....	14
2.1.7. <i>Marketing</i> e Organização da Farmácia.....	15
2.1.8. <i>Cross-selling</i>	15
2.1.9. Equipa da Farmácia.....	16
2.2. Pontos Fracos	17
2.2.1. Realização de poucos testes rápidos	17
2.2.2. Lacunas de formação do MICF.....	17
2.2.3. <i>Upselling</i>	17
2.3. Oportunidades	18
2.3.1. Participação em formações	18
2.3.2. Complemento à formação académica	19
2.3.3. Farmácia de referência em produtos de veterinária	19
2.3.4. Valorização do farmacêutico e da Farmácia enquanto local de prestação de serviços	20
2.3.5. Utentes fidelizados	20

2.3.6. Receita eletrónica e Via Verde do Medicamento.....	20
2.4. Ameaças.....	21
2.4.1. Utentes não dispostos a ser atendidos por estagiários.....	21
2.4.2. Zona de difícil estacionamento e presença de uma paragem de autocarro à porta da farmácia.....	21
2.4.3. Estruturação da UC “Estágio Curricular”.....	22
3. Caso Prático.....	23
3.1. Aconselhamento em preparações de uso veterinário.....	23
4. Conclusão.....	24
Bibliografia referente ao Estágio Curricular.....	25
Parte 2- Monografia intitulada “Anticancer oxysterols”.....	26
Resumo.....	26
Abstract.....	27
Abreviaturas.....	28
1. Introduction.....	29
2. Endogenous oxysterols: biosynthesis and main biological activities.....	30
2.1. Nonezymatic biosynthesis.....	30
2.2. Enzymatic biosynthesis.....	31
2.3. Synthesis in foodstuffs.....	31
2.3.1 The effect of heating treatment.....	32
2.3.2 The effect of unsaturation degree of surrounding lipids.....	32
2.3.3. The effect of the presence of antioxidants.....	33
2.4. Main biological activities of oxysterols.....	33
2.4.1. Ligands of cellular receptors.....	33
2.4.2. Inflammation and atherosclerosis.....	34
2.4.3. Carcinogenesis.....	35
3. Toxicity of oxysterols towards cancer cells.....	37
3.1. 7-Ketocholesterol.....	37

3.2. Dendrogenin A.....	38
3.3. 5,6-Epoxycholesterol	40
4. Modulation of oxysterol cytotoxicity through structural changes of cholesterol.....	43
4.1. Epoxysterols	43
4.2. Ring B substituted steroidal pyrazoline derivatives.....	45
4.3. Ring B modified oxysterols.....	46
4.4. Ring A modified oxysterols	46
4.5. Rings A and B modulation.....	47
5. Conclusion.....	48
Bibliografia referente à Monografia.....	50

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Resumo

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) contempla no seu Plano de Estudos, de acordo com a Diretiva 2013/55/EU, a realização de um Estágio Curricular na área da Farmácia Comunitária que permite ao estudante pôr em prática em contexto de trabalho o conhecimento adquirido ao longo do curso, assim como também adquirir novas competências. O estágio realizado na Farmácia Santa Isabel, sob a orientação da Dr.^a Ana Baptista, e compreendeu a duração de 641h.

O presente relatório, pretende analisar o meu desempenho e evolução ao longo deste estágio através de uma análise SWOT (*Strengths* - Pontos fortes, *Weaknesses* - Pontos fracos, *Opportunities* - Oportunidades, *Threats* – Ameaças), e apresentação de um caso prático do âmbito da área das preparações de use veterinário.

Palavras-chave: Farmácia comunitária, análise SWOT.

Abstract

The Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences contemplates, in accordance with Directive 2013/55 / EU, the realization of a curricular internship in the area of Community Pharmacy, allowing students to apply in the work context the knowledge acquired throughout the course, as well as gaining new skills. The internship was done at Santa Isabel Pharmacy, under the guidance of Dr. Ana Baptista, and comprised the duration of 641 hours.

This report intends to analyze my performance and evolution during the internship through a SWOT (*Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities*, *Threats*) analysis, and the presentation of a practical case from the area of veterinary preparations.

Key-words: Community pharmacy; SWOT analysis.

Abreviaturas

DCI – Denominação comum internacional

FSI – Farmácia Santa Isabel

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento não sujeito a receita médica

MNSRM EF – Medicamento não sujeito a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia

MSRM – Medicamento sujeito a receita médica

OTC – *Over the counter*

SWOT – *Strengths, weaknesses, oportunities, threats*

UC – Unidade curricular

1. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) contempla no seu Plano de Estudos a realização de um Estágio Curricular na área da Farmácia Comunitária que permite ao estudante pôr em prática em contexto de trabalho o conhecimento adquirido ao longo do curso, assim como também adquirir novas competências. Desta forma espera-se que, com o decorrer do estágio, o estudante seja capaz de desempenhar tarefas da competência de um Farmacêutico de forma independente e diligente, de modo a prepará-lo para o seu futuro profissional.

A Farmácia Santa Isabel (FSI), onde fiz o meu estágio, trata-se de uma farmácia com 58 anos de história ao serviço da população de Coimbra. Localizada no nº28 da Avenida Sá da Bandeira, união de freguesias da Sé Nova-Santa Cruz, tem uma localização privilegiada no centro histórico da Cidade, sendo frequentada por um grupo de utentes heterogéneo constituído por: utentes fidelizados, do quais na sua maioria utentes idosos, estudantes e turistas.

A equipa da FSI é constituída pela Dr.^a Ana Baptista, Diretora Técnica, a Dr.^a Ana Vaz, Farmacêutica Substituta, a Dr.^a Ana Rita Rodrigues, Farmacêutica Substituta, o Sr. Rui Borges, Técnico de Farmácia, e o Sr. Rui Costa, Técnico Auxiliar de Farmácia. Contudo, na duração do estágio, o contacto que tive com a Dr.^a Ana Vaz foi menor, pois se encontrava de baixa por maternidade.

2. Análise do Estágio

O estágio teve início a 16 de Abril e término a 19 de Agosto, compreendendo um total de 641 horas, e foi orientado pela Dr.^a Ana Baptista.

A análise do estágio será feita pelo modelo SWOT (*Strengths* – Pontos Fortes, *Weaknesses* – Pontos Fracos, *Opportunities* – Oportunidades, *Threats* – Ameaças). Trata-se de uma técnica útil para identificar as forças e fraquezas da nossa carreira, e também as oportunidades e ameaças a que nos dispõem o mercado e o local de trabalho. Como tal, considero como pontos fortes e fracos fatores internos, respetivamente:

- **Forças:** quais as minhas características e capacidades que me dão uma vantagem no mercado farmacêutico e no local de trabalho;

- **Fraquezas:** quais são os aspetos que tenho de melhorar, comportamentos a evitar e o que outras pessoas identificam como sendo as minhas fraquezas.

Por outro lado, considero como oportunidades e ameaças fatores externos, respetivamente:

- **Oportunidades:** que oportunidades de crescimento me deu a FSI, quais as características do mercado farmacêutico que posso usar a meu favor, que particularidades da farmácia comunitária posso explorar;
- **Ameaças:** quais os aspetos inerentes à FSI e mercado de trabalho que me prejudicam, quais os obstáculos a ultrapassar, que tipo de rivalidade ameaça a minha posição no mercado de trabalho.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Sistematização de tarefas

Aquando da minha receção na FSI foi acordado com a Dr.^a Ana Baptista o horário e explicado o plano de estágio, sendo que inicialmente estive no *back-office* da farmácia para me familiarizar com o espaço, o local de arrumação dos medicamentos e pude observar as metodologias de trabalho de cada um e como elas se interligavam, sendo que cada membro da equipa tem-lhe atribuídas tarefas específicas, e aprendi sobre Gestão de Farmácia e Boas Práticas de Farmácia. Posteriormente passei pelo Laboratório da Farmácia onde fiz medicamentos manipulados e aprendi sobre a norma específica de manipulação de medicamentos¹. E, por fim, o atendimento ao balcão que contempla o aconselhamento farmacêutico e a gestão da área de atendimento.

Isto permitiu-me organizar as minhas tarefas, sendo que anotei como se realizava cada uma delas no meu caderno de anotações, tendo um manual de consulta rápida no caso de dúvida. No final fiquei com um esquema de como devo proceder para realizar cada tarefa com sucesso e como uma ação influencia as restantes.

2.1.2. Realização prévia de um Estágio de Verão em Farmácia Comunitária

Em 2016, após a conclusão do 3º ano do curso, realizei um Estágio de Verão em Farmácia Comunitária que constituiu o meu primeiro contacto com o mundo profissional e com a área farmacêutica comunitária, que se demonstrou de grande utilidade para o presente estágio uma vez que já estava familiarizado com o Sifarma 2000®, já tinha uma noção básica de como se encontram organizadas as farmácias a nível de recursos humanos e também de espaço físico, que apesar de cada farmácia ter as suas particularidades, há sempre aspetos base que permitem uma comparação. Desta forma senti que isto me favoreceu ao início, tornando a aprendizagem mais rápida, e também diminui o receio ou apreensão que poderia estar associado a estagiar pela primeira vez num contexto simulado na prática profissional, com um cariz valorativo, sem experiência prévia.

2.1.3 Conhecimento adquirido ao longo do MICF

No Plano de Estudos do MICF constam Unidades Curriculares (UCs) de elevada relevância para a Farmácia comunitária, nomeadamente nas áreas da farmacologia, plantas medicinais, farmácia clínica e farmácia galénica. Ao ter adquirido estas competências permitiu desempenhar com mais segurança e saber os medicamentos manipulados, e melhorar a qualidade do aconselhamento farmacêutico ao utente, podendo usar as bases científicas do MICF para fundamentar os meus conselhos e ajudar a trespassar as minhas ideias ao utente assegurando que ele compreende a minha mensagem e a sabe replicar em caso de necessidade.

2.1.4. Atendimento de utentes ao balcão

Esta é uma componente da farmácia comunitária que mais me chama à atenção e a que gostei mais no estágio. Julgo que é no atendimento e aconselhamento farmacêutico que se vê mais o nível de profissionalismo e envolvimento do farmacêutico na saúde do utente. É uma área que senti algum à vontade, mais uma vez, por já ter realizado o estágio de verão, onde assisti a muitos atendimentos da Diretora Técnica da respetiva farmácia e pude também fazer alguns. Neste estágio fui ensinado que postura devo ter perante o utente ao balcão e a nível científico pela Dr.^a Ana Baptista e Dr.^a Ana Rita, sendo que me orientaram no sentido de me informar sobre os efeitos dos medicamentos, correta utilização dos mesmos, tanto no caso dos medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) como nos

medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM EF) ou não, e fui incitado a estudar as indicações, efeitos terapêuticos e contraindicações dos medicamentos que podem ser dispensados *over the counter* (OTC), o que teve um contributo pesante sobre a minha capacidade de resposta e desempenho ao balcão.

2.1.5. Atendimento de utentes estrangeiros

Como referi a FSI encontra-se no centro histórico da cidade, e, por este motivo, tem uma grande afluência de turistas, que vêm à farmácia à procura essencialmente de produtos de dermocosmética, cuidados para feridas (picadas de inseto, bolhas, entre outras pequenas feridas) e medicamentos anti-inflamatórios ou anti-histamínicos. De modo a poder atender da melhor forma possível às necessidades destes utentes é fundamental uma boa compreensão do inglês, tratando-se de uma língua falada universalmente, e no meu caso, também um conhecimento de Italiano ao nível A2, favoreceram a minha capacidade de compreender estes utentes e os ajudar da melhor forma possível, sendo que quase diariamente tinha um atendimento a estrangeiros.

De referir que se torna uma excelente oportunidade de fazer aconselhamento em dermocosmética e que em alguns casos, depreende-se que os estrangeiros prestam muita atenção ao conselho do farmacêutico, quer seja por sermos o profissional de saúde mais acessível ao público, ou por um respeito inerente pela profissão nos seus países de origem, nomeadamente em utentes do norte da Europa.

2.1.6. Medicamentos Manipulados

Na FSI existe um número considerável de utentes que chegam com receitas de medicamentos manipulados para fazer segundo a arte. Esta é uma tarefa que realizei várias vezes, inicialmente acompanhado, e posteriormente, em autonomia. Devido às UCs de Farmácia Galénica e a Tecnologia Farmacêutica preparam-nos para fazer os medicamentos manipulados corretamente e segundo as indicações existentes na Farmacopeia e Formulário Galénico.

Fazer estes medicamentos também se demonstra uma boa forma de consolidar conhecimento relativo às indicações terapêuticas, e permite aperfeiçoar as técnicas para

trabalhar de forma correta segundo as Boas Práticas de Farmácia, e ser mais diligente, adquirindo mais destreza e capacidade de organização do trabalho no laboratório.

2.1.7. Marketing e Organização da Farmácia

A área de atendimento da FSI é pequena, como tal, dispõe de poucos lineares para expor todos os seus produtos de saúde, medicamentos e dermocosmética. Desta forma é essencial uma boa gestão do espaço, organizando os lineares de forma racional, expondo os produtos que se pretende que tenham maior rotatividade em zonas quentes, sinalizar promoções assim como fazer montras apelativas. Esta tarefa dá a chance de nos familiarizarmos com os vários produtos das várias gamas de dermocosmética, ajudando no aconselhamento desta área aos utentes, e também nos permite aplicar os ensinamentos prestados na UC de Organização e Gestão Farmacêutica. Como tal, revela-se como uma aplicação prática de Gestão de Farmácia associar os lineares organizados à promoção dos produtos nas redes sociais e fazendo montras apelativas a eventos relevantes para a comunidade e sazonais, como por exemplo, a altura das festas dos Santos Populares e festas académicas, tiveram produtos expostos que ajudam a recuperar de quaisquer excessos cometidos, as festas da Cidade como momento para fazer uma montra mais elaborada, e os *European University Games* que permitiram fazer uma montra que seguisse a temática do desporto apelando à proteção solar e expondo vários produtos de saúde que possam ser usados em caso de lesões.

2.1.8. Cross-selling

A Farmácia comunitária tem a vantagem de ser a área farmacêutica que tem o contacto mais direto com a saúde do doente e o seu bem-estar geral, mas por outro lado tem a grande desvantagem de ter uma vertente de negócio muito grande que obriga a que se tenha de ter sempre em atenção a rentabilidade dos produtos, tendo margens de lucro em todos os produtos de marcação competitivas com as de outras farmácias e parafarmácias mas sem nunca prejudicar o utente e o acesso aos produtos de saúde que este necessitar.

Uma boa forma de manter este equilíbrio entre a rentabilidade e fornecer ao utente as melhores soluções possíveis passa pelo *cross-selling*. Trata-se de vender ao utente um produto que ele pretenda ou necessite e associar à venda desse primeiro produto, outros que vão complementar o efeito do primeiro. Isto é uma boa ferramenta que pode ser utilizada em vendas de dermocosmética pois nas próprias gamas é evidente que os produtos

complementam ou potenciam os seus efeitos entre si, mas mais importante ainda, é quando um utente vem à procura de uma solução para um problema de saúde, como uma constipação, e é possível dispensar medicamentos OTC e produtos de saúde que lhe vão resolver o problema e deixá-lo agradado com o facto de o ter conseguido resolver na farmácia, sem ter de recorrer ao médico para obter uma receita.

2.1.9. Equipa da Farmácia

Tal como supramencionado, a FSI conta com uma equipa que, apesar de pequena, é diversa tanto em categoria profissional (Farmacêuticos, Técnico de Farmácia, Técnico Auxiliar de Farmácia) como em faixa etária. Aqui penso que há dois fatores que se provam como essenciais para um melhor desempenho no estágio:

- A comunicação entre os membros da equipa: como a cada um cabe um role de tarefas que estão, na maioria das vezes, interligadas com as dos demais, foi fundamental uma boa comunicação entre os membros da equipa para harmonizar o trabalho entre nós, desta forma aumentando a produtividade e reduzindo o cometimento de erros o máximo possível;
- A transmissão de conhecimento: pela ótica da faixa etária, a prática profissional inerente significa que independentemente do grau de formação académica, a pessoa detém conhecimento adquirido pela experiência que demonstra ter grande valor para o estagiário para que ele possa complementar a sua formação e conhecimento, e que tenha também uma perspetiva da evolução da farmácia comunitária desde o tempo em que os colegas da equipa começaram a trabalhar, até à atualidade, e refletir a partir daí qual é o caminho a seguir, sempre em busca de um novo e melhorado modelo de farmácia comunitária.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Realização de poucos testes rápidos

A farmácia, enquanto local de prestação de serviços, realiza também testes rápidos bioquímicos, nomeadamente: glicémia e colesterol total. Contudo, foi uma tarefa que não tive muita oportunidade de os realizar, tendo pouca procura por parte do público. Como tal, o meu aconselhamento nesta área, por falta de prática, não se encontra ao nível desejado, sendo algo que deve ser colmatado para o futuro.

2.2.2. Lacunas de formação do MICF

Sendo o estágio o momento em que aplicamos, à prática profissional simulada, os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF, torna-se mais evidente quais são as áreas do saber em que nos sentimos mais à vontade e quais aquelas em que a nossa formação não está tão completa. No caso da FSI, tratando-se de uma farmácia de referência em produtos de veterinária, constatei que os conhecimentos adquiridos até à data na área das Preparações de Uso Veterinário, não eram suficientes para o aconselhamento nesta área, e que a matéria lecionada na respetiva UC carece de uma abordagem aplicada às situações que são mais recorrentes ao balcão. Também a área da dermocosmética sentia alguma dificuldade ao fazer o aconselhamento dos produtos, sendo as gamas das várias marcas extensas e os produtos diferenciados entre si, sendo que a formação adquirida ao longo do curso não nos prepara efetivamente para situações mais práticas, sendo a abordagem muito teórica. Para colmatar estas lacunas foram de essencial importância a presença em formações, e os ensinamentos dados pela Dr.^a Ana Baptista e Dr.^a Ana Rita Rodrigues.

2.2.3. Upselling

A técnica de *upselling* serve para chamar à atenção do utente que pretende comprar um determinado produto, de um semelhante, comparavelmente mais eficaz e de qualidade superior ao anterior, com o fim de o utente ficar melhor servido com a sua aquisição e aumentando o valor da venda. À semelhança do *cross-selling*, esta é uma prática que beneficia mutuamente o utente e a farmácia, contudo senti que é mais difícil de se realizar. O utente, na maioria dos casos, e em particular na dermocosmética, atenta mais na questão económica, do que na qualidade do produto que pretende comprar, e como tal, mesmo apresentando as razões de um determinado produto ser melhor para satisfazer as suas

necessidades, prefere levar o se uma gama mais baixa. Apenas na medicação é que o utente muitas vezes prefere levar o original em detrimento dos medicamentos genéricos, provavelmente por sentir que representa um benefício maior para a sua saúde, que, frequentemente, é uma preocupação superior à da componente estética.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Participação em formações

Ao longo do estágio participei em várias formações proporcionadas por vários laboratórios e indústrias farmacêuticas, e, por vezes, também por parte dos fornecedores de uma categoria específica de produtos, como é o caso da veterinária. Estas eram feitas na farmácia, dentro do horário laboral, ou então no horário pós-laboral, sendo estas formações de maior dimensão, normalmente com o objetivo de divulgar a várias farmácias ao mesmo tempo novos produtos, ou então inovações às gamas existentes, no caso das formações de dermocosmética. Tive a oportunidade de receber formação em áreas diversas, nomeadamente:

- Dermocosmética:
 - La Roche Posay: formação sobre a gama de produtos solares Anthelios, útil para conhecer a extensa gama de produtos, adquirir conhecimento sobre as particularidades de cada um, e favorecer o aconselhamento mais correto sobre estes produtos;
- Auto-cuidados de saúdes:
 - SPCare: formação sobre dois colírios hidratantes, o HidraCare e o DualCare, cada um com indicações diversas, sendo particularmente útil visto que o tópico dos colírios é pouco abordado ao longo do curso, desta forma colmatando essa lacuna;
 - Urgo: formação sobre a tecnologia TENS, utilizada num emplastro de eletroterapia, tendo um efeito analgésico em casos de dores musculares, aprofundando o conhecimento sobre este dispositivo médico em particular;
 - Medinfar: formação sobre Nadiclox (ácido fusídico) e os produtos da gama Halibut, que permitiu aprofundar o conhecimento sobre o tratamento de feridas e assaduras;

- Futuro: formação expositiva e explicativa do funcionamento de vários dispositivos ortopédicos da marca como meias elásticas, punhos para a síndrome do túnel cárpico, cintas, entre outros;
- Suplementação:
 - BioActivo: formação sobre a suplementação de selénio, as suas indicações e público-alvo, apoiada em bases estatísticas e investigação científica.

2.3.2. Complemento à formação académica

Quer pelas formações, quer pela aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do MICF em casos práticos, o estágio provou-se um momento de aprendizagem essencial, assimilando novo conhecimento ao defrontar-me com casos práticos diversos. Ao tentar dar a melhor resposta possível às questões e problemas do utente, a pesquisa de informação adicional sobre medicação, patologias, e o conhecimento transmitido pelos restantes membros da equipa tornam-se uma mais-valia decorrente do estágio. Como tal, no final saí com um saber mais alargado, em particular nas áreas da dermofarmácia e da veterinária, que sinto que eram das minhas maiores dificuldades e que o plano de estudos do MICF deverá sofrer alterações para colmatar essas falhas.

2.3.3. Farmácia de referência em produtos de veterinária

A FSI trata-se de uma farmácia conhecida como referência no que toca à venda e aconselhamento de produtos de veterinária. Diariamente recebe utentes que com problemas desta índole à procura de uma solução, que a farmácia se encontra para responder com o melhor serviço possível, tendo um fornecedor específico de produtos de veterinária, e disponibilizando de um serviço que permite a qualquer momento contactar com médicos veterinários no caso de requerer a sua ajuda. Ademais a equipa tem anos de prática profissional no aconselhamento de produtos de veterinária e participa em formações da área. Ao realizar o meu estágio na FSI fiquei com um aporte de conhecimento na área da veterinária muito superior ao que tinha aquando da finalização das restantes UCs do MICF, pois, como já referi, esta é uma área em que a nossa formação é mais débil.

2.3.4. Valorização do farmacêutico e da Farmácia enquanto local de prestação de serviços

Um aspeto positivo que observei no estágio foi uma maior valorização do farmacêutico, como agente de saúde pública, do que apenas um “vendedor”, como muitas vezes somos apelidados. É perceptível que o doente reconhece a farmácia como um local que lhe pode prestar serviço que melhorem a sua saúde e o seu bem estar, em particular a realização de testes rápidos, o aconselhamento nutricional e a consulta de podologia, e reconhece o farmacêutico como um profissional de saúde capaz de aconselhar medicamentos, produtos de saúde e medidas não farmacológicas para a resolução de problemas de saúde menores, evitando assim ter de deslocar ao seu médico ou às urgências, mas sempre mantendo o discernimento de quando em qualquer situação o utente deve ser referenciado ao médico, para uma avaliação mais especializada do seu caso.

Tudo isto torna o atendimento ao balcão, uma tarefa mais agradável e gratificante quando vemos que estamos a ser ouvidos, e o nosso conselho tomado em consideração.

2.3.5. Utentes fidelizados

O utente fidelizado é uma grande mais-valia para a farmácia, e, no caso da FSI, uma quantidade considerável dos utentes pode ser considerada fidelizada, em especial aqueles de uma faixa etária mais velha. Utentes fidelizados permitem conhecer o historial psicossocial do utente e o seu historial de medicação e patologias. Desta forma, permite um atendimento mais intimista, mais focado nas questões que afligem aqueles doentes, e uma oportunidade de fazer revisão e avaliação da farmacoterapia, perceber se a medicação que o doente toma é efetiva ou não, e se surte efeitos secundários indesejáveis que possam ser motivo para interromper de imediato a medicação e de referenciar ao médico.

2.3.6. Receita eletrónica e Via Verde do Medicamento

A atualização do modelo de dispensa de MSRM das receitas manuais para a receita eletrónica sem papel apresenta uma mais-valia para as farmácias comunitárias e para a saúde do doente. O medicamento prescrito por denominação comum internacional (DCI) e grupo homogéneo facilita, através do sistema Sifarma, escolher o medicamento correto de acordo com a prescrição, e dá ao utente o direito de escolher a medicação que pretende levantar consoante as suas necessidades no momento, sendo que a receita não perde utilidade se não

for dispensada na sua totalidade, desde que se encontre dentro do seu prazo de validade. Isto também leva que se reduza os erros de troca de medicação na dispensa, sendo um procedimento mais controlado por parte do sistema informático e seguro para o doente.

Acresce às vantagens da receita eletrónica o projeto da Via Verde do Medicamento (VVM). Consiste numa via de acesso a medicamentos rateados e/ou cuja exportação/distribuição carece de notificação ao INFARMED, I.P. caso o utente apresente uma receita médica válida, desta forma pode-se acionar a VVM, e o distribuidor aderente ao programa concede a este pedido, fornecendo o medicamento de um *stock* reservado para este canal, atribuído pelo titular de AIM do mesmo². Assim sendo, dá à farmácia a oportunidade de atender melhor às necessidades dos seus utentes, caso não tenha alguma da sua medicação em *stock*, que faça parte da lista de medicamentos do projeto.

2.4. Ameaças

2.4.1. Utentes não dispostos a ser atendidos por estagiários

Tratando-se a FSI de uma farmácia com muitos anos, tem utentes que já aviam lá as suas receitas há muito tempo e estão habituadas a um certo tipo de atendimento. Portanto, quando um membro novo entra para a equipa, em muitos casos, é estranhado pelo público, ficando receosos de ser atendidos por nós, ou então pedindo para ser atendido pelas pessoas do costume. Isto constitui a perda de um momento de aprendizagem, e uma desvalorização dos conhecimentos e capacidades de cada estagiário.

Em retrospectiva, após atender estes utentes a primeira vez, penso que, na maioria dos casos, fui capaz de apaziguar estes receios, não descorando a minha postura profissional, mantendo a humildade de que, estando ainda em formação, procurei saber sempre mais, junto dos restantes membros da equipa, e através de outros meios. Desta forma, o utente viu as suas necessidades satisfeitas e mais à vontade para ser novamente atendido por mim.

2.4.2. Zona de difícil estacionamento e presença de uma paragem de autocarro à porta da farmácia

Apesar de ter referido que a localização central da farmácia é uma mais-valia, que o é, por atrair muito publico diversificado, encontra-se numa zona cujo estacionamento é todo com parquímetro, desencorajando as pessoas a frequentar a FSI. Por outro lado, a presença de uma paragem de autocarro mesmo à porta da farmácia, facilita o acesso à mesma, mas os

utentes aguardam por se dirigir à farmácia poucos momentos antes de ter de apanhar o seu transporte, resultando em atendimentos apressados e pressionados por parte do utente. Isto impede-nos de desempenhar o atendimento da melhor forma, resultando numa ameaça também ao processo de aprendizagem.

2.4.3. Estruturação da UC “Estágio Curricular”

De acordo com a Diretiva 2013/55/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2013, a UC “Estágio Curricular” foi planeada de modo a englobar a realização de um estágio de pelo menos 6 meses, obrigatório conforme a diretiva, e além disso a realização de uma Monografia com um tema abrangido pelo Ato Farmacêutico, sendo que esta, em conjunto com o relatório do estágio ou estágios, são os objetos de avaliação final. A meu ver, esta estruturação da UC constitui uma ameaça para o estudante, pelos seguintes motivos: a tendência cada vez maior para a realização de estágios em mais do que uma área da Ciências Farmacêuticas e a conjugação do estágio com a redação da Monografia.

Uma vez que ao longo do MICEF não existe nenhuma obrigatoriedade de realizar um estágio em qualquer área, os estudantes aproveitam o Estágio Curricular para adquirirem conhecimento e experiência específica nessas áreas, desta forma enriquecendo o seu currículo, uma vez que é o momento em que estamos mais equipados com as ferramentas necessárias para trabalhar, e nos distinguirá no mercado de trabalho. Como tal, quem faz estes estágios, realiza um maior número de horas, traduzindo-se em mais tempo de estágio, tempo este que tem de ser dividido com a redação da Monografia. Por sua vez, a Monografia requer muito tempo de trabalho, eu ao estagiar uma média de 8 horas por dia, torna-se mais difícil realizar este trabalho, sendo que a solução para grande parte dos estudantes é realizar mais horas de estágio por dia, de modo a conseguirem terminar a tempo de se dedicarem exclusivamente à mesma. Penso que seria útil repensar o modelo da UC, para uma maior valorização do trabalho realizado nos estágios.

3. Caso Prático

3.1. Aconselhamento em preparações de uso veterinário

Um utente dirige-se à farmácia, queixando-se que o seu cão se encontra parasitado com pulgas, apesar de lhe aplicar as pipetas mensalmente. Após questionado, disse que as pipetas que usa são Advantage[®], cujo princípio ativo é a imidaclopride³, atuando ligando-se aos recetores nicotínicos de acetilcolina, provocando paralisia e morte dos ectoparasitas. Questionei acerca do método de aplicação das pipetas, para tentar perceber se a desparasitação estava a ser feita corretamente, aplicando a pipeta junto à pele do cão e desde a zona do cachaço ao dorso. O utente demonstrou saber aplicar a pipeta, por esta razão, expliquei que a imidaclopride se trata de uma molécula com muitos anos de uso, e que é possível que os ectoparasitas, como a pulga, desenvolvam resistências aos mesmos. Como tal aconselhei que desparasitasse o cão com Simparica[®], cujo princípio é sarolaner⁴, atuando pela inibição dos recetores GABA e do glutamato, causando excitação neuromuscular excessiva e morte. Cada caixa de Simparica[®] trás 3 comprimidos com duração de efeito de 5 semanas, logo apresenta uma vantagem sobre as pipetas que só conferem proteção durante 4 semanas, e o comprimido, sendo palatável e com sabor a carne é mais apelativo para o cão e mais fácil de administrar que as pipetas. Por fim foi explicado ao senhor que é normal observar pulgas no cão, especialmente se ele andar ao ar livre, pois as pulgas morrem só após picar, e ingerirem o sarolaner, mas que a proteção do cão está assegurada.

4. Conclusão

O estágio curricular em farmácia comunitária provou ser de grande importância para compreender quais os campos de ação do farmacêutico na farmácia e junto do público, o que o distingue dos outros profissionais de saúde e mesmo das outras categorias de farmacêuticos nos restantes segmentos das ciências farmacêuticas.

Entendo o farmacêutico comunitário como um profissional capaz de intervir ativamente na saúde e bem-estar dos utentes e doentes, e sendo, por este motivo respeitado pelo público. Como tal, vejo a farmácia comunitária como mais do que um local para dispensar medicação, mas em vez como um espaço de saúde, através do aconselhamento farmacoterapêutico e dermocosmético, mas também no aconselhamento de dispositivos médicos e preparações de uso veterinário, e na prestação de serviços de saúde complementares, nomeadamente o aconselhamento nutricional e a podologia.

Foi notório que o conceito de farmácia comunitária está sujeito a evolução, uma vez que já se encontram diferenças marcadas em relação aos antigos modelos de farmácia, que se denota pelo desuso da designação de farmácia de oficina. Como tal, percebo que existem fatores limitantes ao crescimento desta área, e estes são intrínsecos e extrínsecos. A nível interno, a correta gestão de farmácia deve seguir procedimentos que asseguram a rentabilidade da farmácia e manter um serviço digno para o utente, mas que carecem de muita análise, confirmação e, acima de tudo, tempo do farmacêutico. Refiro-me em particular ao aprovisionamento que engloba muitas tarefas (entrada de encomendas, comparação de preços, gestão correta de *stocks*, armazenamento, gestão de validades), a faturação mensal, entre outros. A nível externo, a farmácia deve apostar em competitividade leal dentro do sector, e deve apostar em medidas diferenciadoras dos restantes setores de saúde que lhe sirvam como vantagem para tornar a farmácia comunitária num espaço ainda mais completo e diversificado no tipo de serviços que pode fornecer ao público, como por exemplo a revisão de medicação, que, a meu ver, ainda é uma prática pouco realizada, e procurar maior interligação com os restantes profissionais de saúde.

Em suma, reconheço a farmácia comunitária, em todas as suas vertentes, e o farmacêutico, como uma necessidade para o público e o Serviço Nacional de Saúde, sendo o ponto de acesso à saúde mais próximo da população e levando a cabo as medidas tomadas pelos restantes profissionais de saúde, pela dispensa de medicação e aconselhamento farmacêutico, completando o ciclo da procura e obtenção de ajuda.

Bibliografia referente ao Estágio Curricular

1. Ordem dos Farmacêuticos, Norma específica sobre manipulação de medicamentos, OF.C-N006-00, Boas Práticas de Farmácia Comunitária,
2. INFARMED, I. P. Projeto Via Verde do Medicamento. *Circ. Inf. N.º 019/CD/100.20.200* (2015) 4–5.
3. RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO – Advantage 250[®], Direção Geral de Alimentação e Veterinária, (2017).
4. RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO – Simparica[®], Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2015).

Parte 2- Monografia intitulada “Anticancer oxysterols”

Resumo

O cancro afeta grande parte da população mundial, tendo-se tornado uma das principais causas de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2008, 7,6 milhões de pessoas morreram de cancro e esse número aumentou para 8,8 milhões de mortes em 2015. Estima-se que, se nenhuma ação imediata for tomada, até 2030 o número global de mortes causadas pela doença aumentará em quase 80%. Dadas estas estatísticas, surge a necessidade de pesquisa de fármacos citotóxicos mais potentes e específicos para células cancerígenas.

Oxiesteróis, produtos da oxidação do colesterol, destacam-se como moléculas de grande importância fisiológica, pois estão envolvidos numa grande variedade de processos fisiológicos, sendo ligandos de vários recetores celulares e da membrana citoplasmática, regulando o metabolismo lipídico, inflamação, viabilidade celular e afetando a fisiopatologia de várias doenças, como aterosclerose e cancro. As suas propriedades citotóxicas são aprofundadas nesta monografia, assim como sua capacidade de serem a matéria-prima de novos e melhorados fármacos anti-tumorais, através da síntese de novos oxiesteróis e da modulação do esqueleto base dos esteróides.

Palavras-Chave: Oxiesteróis; 7-cetocolesterol; Dendrogenina A; 5,6-epoxicolesterol; Anticancerígeno.

Abstract

Cancer affects a large part of the population, having become a leading cause of death worldwide. According to the World Health Organization, in 2008, 7.6 million people died from cancer and this number has increased to 8.8 million deaths in 2015. It is estimated that, if no immediate action is taken, by the year 2030 the global number of deaths from cancer will increase by almost 80%. Given these statistics, the need arises for research of more potent and selective cytotoxic drugs towards cancer cells.

Oxysterols, cholesterol oxidation products, stand out as molecules of high physiological importance, since they are involved in a plethora of physiological processes, being ligands of various cellular and membrane receptors, regulating lipid metabolism, inflammation, cell viability, and affecting the pathophysiology of various diseases, such as atherosclerosis and cancer. Their cytotoxic properties are further analyzed in this monograph, as well as their capacity to be the source of new and improved anticancer drugs, by synthesizing new oxysterols and modulation of the cholesterol backbone.

Key-words: Oxysterols, 7-ketocholesterol, Dendrogenin A; 5,6-epoxycholesterol; Anticancer.

Abreviaturas

AI – Aromatase inhibitor

BC – Breast cancer

ChEH – Cholesterol epoxide hydroxylase

Chol – Cholesterol

CNS – Central nervous system

CML – Chronic myeloid leukemia

CT – Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol

DDA – Dendrogenin A

DHA – Docosahexaenoic acid

DHCR7 – 3 β -Hydroxysterol- Δ^7 -reductase

D8D7I – 3 β -Hydroxysterol- $\Delta^{8,7}$ -isomerase

EC – 5,6-Epoxycholesterol

5,6 α -ECS – 5,6 α -Epoxy-cholesterol-3 β -sulfate

ER – Estrogen receptor

KC – Ketocholesterol

KD – Knockdown

LXR – Liver X Receptor

MDR – Multidrug resistance

MMPP – Magnesium bis(monoperoxyphthalate) hexahydrate

MMPs – Metalloproteinases

OHC – Hydroxycholesterol

P-gp – P-Glycoprotein

ROS – Reactive oxygen species

SAR – Structure-activity relationships

Tam – Tamoxifen

I. Introduction

Cancer affects a large part of the population, having become a leading cause of death worldwide. According to the World Health Organization (**WHO**), in 2008, 7.6 million people died from cancer and this number has increased to 8.8 million deaths in 2015¹. It is estimated that, if no immediate action is taken, by the year 2030 the global number of deaths from cancer will increase by almost 80%².

The most commonly used strategies to fight cancer are surgery and chemotherapy. The principle of chemotherapy is based on the theory that rapidly proliferating cells have a higher sensibility to cytotoxic and cytostatic drugs. However, aside from the various side effects from this therapy, cancer, as a multifactorial disease, whose etiology can be attributed to a wide number of genetic and environmental factors, also tends to develop drug resistance. As such, the need arises for the search and synthesis of more potent anticancer drugs, with better selectivity for cancer cells, diminishing the negative side effects^{2,3}.

In this sense, when observing compounds in Nature, it is worth considering whether they might represent a source of bioactive compounds that may lead to the discovery of new molecules through design and synthesis³.

Steroids represent a group of molecules with a common base structure that perform a wide number of functions in the human physiology³. Cholesterol (chol) is a molecule of major biological importance, and part of the steroid family of compounds, existing abundantly in the plasma membrane of mammalian cells, influencing their fluidity and the packing of phospholipids, representing about 25-40 mol% of the total lipid content⁴. Chol is involved in the regulation of various biological processes, as it interacts directly with proteins embedded in the membranes, or indirectly modulating protein function, through the regulation of the properties of lipid bilayers⁴. Chol is also a precursor in the synthesis of bioactive molecules such as steroid hormones and bile acids⁵.

Oxysterols are oxygenated derivatives of cholesterol present in the lipid bilayers, blood, tissues and fluids of animals as well as in foodstuffs³. These molecules have been shown to be involved in the pathophysiology of various diseases, especially those in which they exert strong pro-inflammatory effects, such as vascular aging, atherosclerosis, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, colorectal cancer, non-alcoholic liver disease, retinopathies and diabetes mellitus⁵. Furthermore, oxysterols have

also been shown to be involved in cancer disease progression in different ways in different cell lines⁶.

A procancerous and proliferative effect of oxysterols has been reported, which might be attributed to their pro-inflammatory properties and influence in signaling pathways. Conversely, they have also been shown to produce proapoptotic and cytotoxic effects on tumor cells, by interfering with cellular physiology⁶.

Considering the information collected, it seems evident that oxysterols are molecules of interest in the search of new molecules for the treatment of cancer, and the effects of different oxysterol on different cell lines must be evaluated.

2. Endogenous oxysterols: biosynthesis and main biological activities

Endogenous oxysterols are 27-carbon molecules that originated from the oxidation of chol present in the human body⁵ and in foodstuffs⁷. Oxidized chol (oxysterols) differ from their precursor by the presence of additional polar groups, such as hydroxyl, keto, hydroperoxy, epoxy or carboxyl moieties, in the sterol ring system or in the side chain. The reactions that lead to the formation of oxysterols can be characterized as nonenzymatic, mainly forming ring system oxidized products, or enzymatic, mainly forming side chain oxidized products. However, it must be pointed out that there are a few exceptions to this rule⁴. For example, 4 β -hydroxycholesterol (4 β -OHC) and 7 α -OHC are sterol nucleus oxidation products formed enzymatically³.

2.1. Nonenzymatic biosynthesis

Nonenzymatic, or autoxidative, oxidation happens due to the reaction of chol with reactive oxygen species (ROS), which are physiologically present in the body. This interaction is responsible for the abstraction of hydrogen from the C-7 position, forming a radical carbon that, in turn reacts with oxygen, forming a cholesterol peroxy radical (COO^{*}). This long-living radical can then abstract hydrogen from other lipids, forming a more stable cholesterol hydroperoxide at the C-7 position (7 α - or 7 β -OOH-chol). Further transformation of these molecules leads to the formation of hydroxycholesteols (OHCs) and ketocholesterols (KCs), respectively, 7 α - or 7 β -OHC, and 7-KC, being the most abundant oxysterols in most tissues, formed nonenzymatically⁴.

2.2. Enzymatic biosynthesis

Enzymatic oxidation depends on the activity of various enzymes of the cytochrome P450 family, encompassing, for example: CYP46A1, an enzyme expressed in the brain, which catalyzes the formation of 24S-OHC; CYP7A1 and CYP27A1 that lead to the formation of the side chain oxysterol 27-OHC and the ring oxidized sterol 7 α -OHC, referred to above, as one of the exceptions in the oxysterol biosynthesis at ring B; Cholesterol 25-hydroxylase, present in the endoplasmic reticulum and golgi apparatus of cells in most tissues, catalyzes the formation of 25-OHC. 24S,25-Epoxy-chol stands out as a physiological side chain oxysterol, as it is a side product of chol biosynthesis, enzymatically generated⁴.

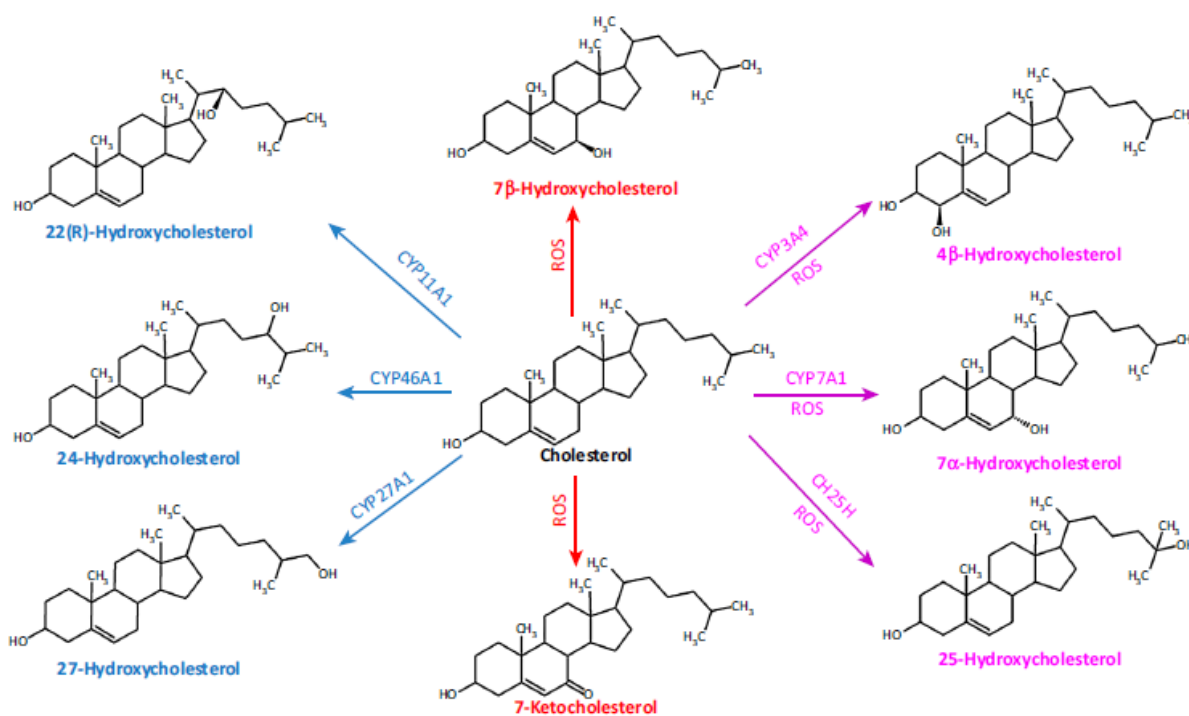


Figure 1. Synthesis of various oxysterols via enzymatic (blue), nonenzymatic (red), and both enzymatic and nonenzymatic (purple) pathways. Adapted from Kloudova *et al.* (2017)⁶.

2.3. Synthesis in foodstuffs

It has shown that oxysterols present in food are absorbed into circulation. Oxysterol formation in foodstuffs is common in highly processed foods, and is influenced by the food composition, storage conditions, preparation procedures and presence of phytosterols, which are added to exert a reduction of LDL plasma levels.

High chol intake diets are related to a higher cardiovascular disease incidence and the oxidation products of chol have been associated with toxicological effects. Therefore, knowing the effect of different factors in chol oxidation is of high interest.

For this reason, a research group by Barriuso *et al.* (2017)⁷ studied the effect of the: **1.** heating treatment; **2.** unsaturation degree of surrounding lipids; and **3.** presence of antioxidant; in sterol oxidation, regarding four different sterols: cholesterol, campesterol, stigmasterol and sitosterol.

2.3.1 The effect of heating treatment

Heating treatment induces lipid oxidation by lowering the activation energy required for hydrogen abstraction which leads to the formation free radicals, so heat intensity and time are key in sterol oxidation. This means, heating promotes autoxidation, forming oxysterols such as 7-KC or 7-OHC⁷.

The samples were heated at a temperature of 180°C, which is commonly used in cooking and ensures full melting of sterols. All experiments resulted in drastic sterol oxidation, exceeding 50% of sterol degradation. The sterol oxidation products started being formed very early in the heating process, reaching its peak value at around 5-20 minutes, depending on the sample, and decreasing afterwards. This decrease could be explained by the formation of further oxidized molecules due to the continuation of the heating treatment.

2.3.2 The effect of unsaturation degree of surrounding lipids

It is thought that the surrounding lipid matrix could have a protective effect over the sterol susceptibility to oxidation, or instead, a high unsaturated lipid matrix could further promote sterol oxidation. The basis for these reasoning is that surrounding lipids could compete with sterols for oxygen and reduce their oxidation. This would be an effect expected of unsaturated lipids, over saturated ones, as double bonds are far more susceptible to oxidation. Conversely, lipid oxidation leading to the formation of radicals and oxygenated species could exert a pro-oxidant effect in other sterols⁷.

To evaluate this effect, the four sterols in study were heated in differed lipid matrixes with fatty acid methyl esters, triacylglycerides and free docosahexaenoic acid (DHA). The

results showed that only chol + DHA promoted the formation of sterol oxidized products, whereas, in general, the presence of lipids exerted a protective effect against oxidation.⁷

2.3.3. The effect of the presence of antioxidants

To assess the ability of antioxidants to protect sterols from oxidation, chol oxidation with heat treatment was evaluated in matrixes containing *Melissa officinalis* (Melissa) and *Solanum sessiliflorum* (mana-cubiu). These plant extracts showed promising antioxidant properties for being rich in phenolic acids, specifically, rosmarinic acid in melissa and 5 α -caffeoylquinic acid in mana-cuibu, present in their aqueous extracts⁷.

The results of this experiment showed that both plant extracts successfully lowered chol oxidation, in isolated model systems. However, when tested in food systems (beef or tuna patties), it was evidenced that these phenolic acids didn't effectively exert an antioxidant effect, probably due to other polyunsaturated lipids present in the food. As such, foods with a higher polyunsaturated lipid content require a higher amount of antioxidant compounds⁷.

2.4. Main biological activities of oxysterols

As previously mentioned, oxysterols are involved in a plethora of physiological processes. They are ligands of various cellular and membrane receptors, regulate lipid metabolism, inflammation, cell viability, and are involved in the pathophysiology of various diseases, such as atherosclerosis and cancer⁴.

2.4.1. Ligands of cellular receptors

Side chain oxysterols act as physiological ligands of Liver X Receptors (LXR)³, members of the nuclear receptor family, that act as ligand-activated transcription factors⁸, and regulate chol, fatty acid and glucose metabolism⁴. Some endogenous agonists of LXR include: 20(S)-, 24(S)-, 22(R)-, 27-OHCs and 24,25-epoxycholesterol (EC)⁸.

Structurally, as members of the nuclear receptor superfamily, LXRs are comprised of three domains: i) an amino-terminal domain which regulates the transcriptional activity, subjected to regulatory post-translational modifications; ii) a central DNA-binding domain responsible for recognizing and binding to the LXR response element, which are specific

DNA sequences; iii) a carboxy-terminal domain, containing a specific hydrophobic region for ligand binding and susceptible to co-activators and co-repressors⁸.

Of interest, among the activities of LXR, is their influence in cancer progression mediated by oxysterols. Oxysterol-mediated proapoptotic effects of these nuclear receptors include inhibition of cell proliferation in some cancer cell lines, such as in breast and prostate, colorectal, and skin cancer. However, LXR have been shown to inhibit inflammatory signaling, through negative regulation of macrophage inflammatory gene response, inhibiting antitumor immune response, but, tumor-derived oxysterols are recruiters of protumor neutrophils^{4,6}.

Oxysterols bind to antiestrogen-binding sites (AEBS), made up of two cholesterol metabolizing enzymes: 3β -hydroxycholesterol- Δ^7 -reductase (DHCR7) and 3β -hydroxycholesterol- $\Delta^8\Delta^7$ -isomerase (D8D7I). This binding site is one of the targets of selective estrogen receptor modulator (SERM) drugs, such as Tamoxifen (Tam), for the treatment of estrogen receptor (ER) positive breast cancer. It has been determined that AEBSs and ChEH share similar characteristic and pharmacological properties. The substrate of ChEH 5,6-EC and its product Cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol (CT) are all competitive ligands of AEBS, and similarly ring B oxysterols and synthetic ligands of AEBS inhibited ChEH with the same order of potency⁹. In addition, the AEBS complex is reported to carry out the activity of ChEH activity⁶. 7-KC, 7-ketocholestanol and 6-ketocholestanol are some ligands of this binding site.

2.4.2. Inflammation and atherosclerosis

Beyond their physiological involvement, oxysterols are related to pathological conditions, especially those associated with chronic inflammation⁴. Atherosclerosis is a disease influenced by inflammatory processes. The normal function of arteries highly depends on the maintenance of healthy endothelial cells which make up their interior lining. The proper function of these cells is dependent of endoplasmatic reticulum, responsible for protein folding and lipid synthesis. However, endoplasmatic reticulum stress (ERS) can be induced by oxysterols resulting in protein modification by free radicals, inducing a gain or loss of function due to protein misfolding. Since proteins are the effectors of most cellular processes, cells in a state of proteotoxic stress activate specific and integrated cellular pathways in order to maintain the integrity of the proteome. One of these pathways is the unfolded protein response, that senses the increase in the concentration of misfolded

proteins and induces the synthesis of folding catalysts, to increase protein folding. A parallel process known as endoplasmic reticulum associated degradation, degrades misfolded proteins that have been translocated back to the endoplasmic reticulum. ERS also increases cell autophagy which is necessary for normal cell function, however if excessively increased can aggravate cell injury¹⁰.

An oxysterol that has been reported to induce ERS and UPR, leading to apoptosis under prolonged stress exposure, is 7-KC, one of the main oxidation products of LDL. In a study by Rosa-Fernandes *et al.* (2017)¹¹, where endothelial cells were exposed to 7-KC for 24h at a non-toxic concentration, as to not reduce cell viability, changes in the expression of intracellular proteins and secreted protein composition were observed. Up and downregulation of three proteins showed to be associated with the effect of 7-KC over atherosclerotic progress, in particular:

- Semaphoring 3C (Sema3C) is downregulated, which is an important protein in the process of vessel normalization, aiming to restore the structural and functional new vessels formed in atherosclerotic plaques, reducing necrotic expansion and restraining the inflammation process¹¹;
- Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) is downregulated. Tissue factor exposure in blood vessel wall injury triggers the extrinsic coagulation cascade, and the serine protease TFPI is secreted by endothelial cells, preventing occlusive thrombosis, by regulating tissue factor activity¹¹;
- RhoC is upregulated, being part of a family of small GTPases, RhoC increases cell proliferation while decreasing its migration and permeability. As such, RhoC upregulation might be associated with an effort to maintain vascular homeostasis¹¹.

2.4.3. Carcinogenesis

In comparison to what was observed in the atherosclerotic disease, oxysterols, under certain pathological conditions, can influence the progression of cancer, by exacerbating inflammatory processes and through modulation of the immune system.

High chol diets are known to be a high-risk factor for the development of colorectal cancer. Oxysterols, as part of the matrix of the consumed food and as a result of chol oxidation, have been shown to affect intestinal epithelial cell monolayer integrity, in an *in vitro* study by Deiana, *et al.* (2017)¹². It was observed that dietary oxysterols induced the

activation of metalloproteinases (MMPs) MMP-9 and MMP-2, which are activated through inflammatory processes. The ability of oxysterols to induce an oxidative environment in these cells, through upregulation of NADPH oxidase, triggers the cysteine switch, essential in enzyme activation, and indirectly triggering inflammatory signaling pathways, resulting in the activation of MMPs. This leads to the degradation of the extracellular matrix, through the disruption of lipid rafts domains of the plasma membrane, where NADPH oxidase is located, and degradation of tight junctions, increasing the permeability of the epithelial layer. Some oxysterols that exert this effect are 7 α - and 7 β -OHC, 7-KC, epoxysterols and 27-OHC¹².

Side chain oxysterols, such as 27-OHC and 22(R)-OHC, have been shown evidence of promoting breast cancer progression. Both of these compounds chemotactically attract neutrophils considered to favor cancer cell growth, through activation of the G protein-coupled CXCR2 chemokine receptor¹³. Furthermore, in a study by Baek, *et al.* (2017)¹⁴, it was observed that 27-OHC played a role in increasing metastasis by priming the distal site of the primary tumor through the modulation of the immune system myeloid cells, sensitive to clodronate-liposome, and by $\gamma\delta$ -T cells, which infiltrate tumors and promote metastasis by secreting IL-17, which polarizes polymorphonuclear neutrophils, leading to the suppression of the role of cytotoxic CD8⁺ T cells within tumors and metastatic lesions¹⁴.

In breast cancer, 7-KC has been reported to decrease the sensitivity of cancer cells to doxorubicin. 7-KC upregulated the expression of P-glycoprotein (P-gp), an efflux pump of various substances in the cell. Doxorubicin, being identified as a substrate for P-gp, was unable to accumulate at high concentrations inside the cell. This induction of the P-gp was due to the activation of the phosphorylation signaling pathway of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and mTOR, the mammalian target for rapamycin. The estrogenic activity of 7-KC also influenced the expression of P-gp, and KD of ER α in MCF-7 cells restored doxorubicin accumulation¹⁵.

3. Toxicity of oxysterols towards cancer cells

It has been evidenced that oxysterols have a role in cancer progression and can exert a cytotoxic effect towards various cancer cell lines, thus it is worth a closer observation at the biological activity of some oxysterols and how their activity differs between them.

3.1. 7-Ketocholesterol

In chronic myeloid leukemia (CML), a genetic error gives rise to a fusion tyrosine kinase designated BCR-ABL which gives makes possible a target-oriented treatment with tyrosine kinase inhibitors, which imatinib mesylate is a part of. However, the progression of the disease gives rise to various mechanisms of drug resistance toward imatinib, and other drugs, being hard to pinpoint the exact origin and mechanisms of this multidrug resistance (MDR)¹⁶.

A recent study evaluated whether 7-KC induced oxiaoptophagy, a complex form of cell death, named characterized a reduction of cell proliferation, augmented membrane permeability, nucleus condensation, a decreased production of nitric oxide and oxidative damage to DNA¹⁶. To further the knowledge of this effect, in a study by Rosa Fernandes, et al. (2017)¹⁶, 7-KC cytotoxicity towards k562 leukemia cells and a multidrug resistant counterpart, Lucena was evaluated. Results showed that 7-KC reduced cell viability of both cell lines, however, Lucena required a much higher concentration of the oxysterol to exert its effect ($IC_{50} = 103.87 \pm 1.64 \mu\text{M}$ at 24h for Lucena and $IC_{50} = 60.43 \pm 3.08 \mu\text{M}$ for K562). Apoptosis was registered in both cell lines with a similar extension, this was due to phosphatidylserine exposure, outer mitochondrial membrane permeabilization and mitochondrial membrane potential loss, causing ERS and activating the p53 pathway, both triggering apoptosis. Caspase was also detected in the CML lines. Both loss of mitochondrial membrane potential and the activation of caspase evidence the multiple apoptotic pathway of 7-KC¹⁶.

The samples were also fractioned into cytoplasm and nuclear enriched fractions the proteins were analyzed to further evidence the cytotoxic effect of 7-KC and its capacity to surpass the MDR. Results showed that, after treatment with 7-KC, 333 proteins were upregulated and 291 were downregulated, proposing an effect over protein expression. API5, an anti-apoptotic protein, described to be overexpressed in various cancer cells, was downregulated, and CDK6, a protein responsible for cell cycle progression was also

downregulated, resulting in the arrest of the cell cycle and inhibition of proliferation. Together, this downregulation suggests that it induces apoptosis, cell cycle arrest and inhibition of cell proliferation. The protein disulfide isomerase (PDI) family of proteins was found to be upregulated after treatment of Lucena with 7-KC. ERS in eukaryotic cells induces the expression of these proteins to prevent aggregation of misfolded proteins. PDI overexpression, however, triggers a pro-apoptotic signal, by increasing mitochondrial membrane permeability.

7-KC was also co-incubated with daunorubicin and vincristine, to evaluate the combinatory effect over cytotoxicity towards K562 and Lucena. In both cell lines, treatment with oxysterol allowed reduction of the required minimum concentration of daunorubicin and vincristine by over a 10-fold factor¹⁶.

Gathering all these findings it was possible to evidence that 7-KC has a good cytotoxic activity towards CML cells, either normal or MDR phenotype, and has the potential to act as a sensitizer of chemotherapy, by reducing the minimum concentration required of the chemotherapeutic drugs to reduced cell viability¹⁶.

3.2. Dendrogenin A

A metabolite of chol, named dendrogenin A (DDA), was discovered and has demonstrated anticancer properties¹⁷. Its synthesis in normal mammalian tissue derives from the enzymatic reaction of chol oxidation metabolite 5,6 α -EC with histamine¹⁸.

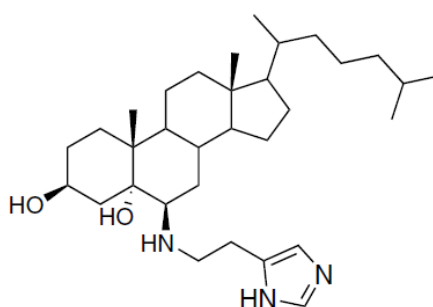


Figure 2. DDA structure, adapted from Segala, G. *et al.* (2017)¹⁷

In a study by Segala, G. *et al.* (2017)¹⁷, it was demonstrated in melanoma and acute myeloid leukemia (AML) cells that the anticancer effect of DDA is due to a novel mechanism, involving lethal autophagy, through the inhibition of the D8D7I enzyme of the ChEH, and through the agonist action of LXR β ¹⁷.

In melanoma cells, DDA induced the accumulation of Δ^8 -sterols, the substrate of D8D7I, by inhibiting this enzyme, and its cytotoxic effect wasn't decreased by caspase inhibitors and antioxidants, indicating that it induces lethal autophagy through other pathways. It was evidenced that DDA increases the translation and expression of the transcription factors NR4A1 and NR4A3, responsible for the synthesis of Nur77 and NOR1, respectively, and leads to the accumulation of autolysosomes. This effect leads to lethal autophagy and is incremented by the accumulation of the Δ^8 -sterols, which exert even more autophagic stress. The knockdown (KD) of the transcription factors inhibited DDA cytotoxicity, thus they are part of the mechanism that leads to lethal autophagy. DDA also increased the expression of LC3-II, a main autophagy protein¹⁷. Its cytotoxicity was inhibited by acytomicin D and cycloheximide, indicating that DDA requires gene translation and transcription to exert its cytotoxic effect.

To further understand how DDA controls the expression of these genes, its affinity for nuclear receptors was examined, and it was found that DDA is a non-selective ligand of both LXR α and LXR β isoforms. Particularly important for the cytotoxic effect of DDA is the LXR β , as its knockdown inhibited DDA cytotoxic effect, and is responsible for the expression of Nur77, NOR1 and LC3, leading to lethal autophagy¹⁷.

In the case of AML cells, Nur 77 and NOR1 levels are usually decreased and this has been shown to induce cancer progression. DDA has showed to be capable of reinstating the expression of these proteins, leading to lethal autophagy, and, in similarity to what happens in melanoma cells, the KD of LXR β inhibits the cytotoxic effect of DDA.

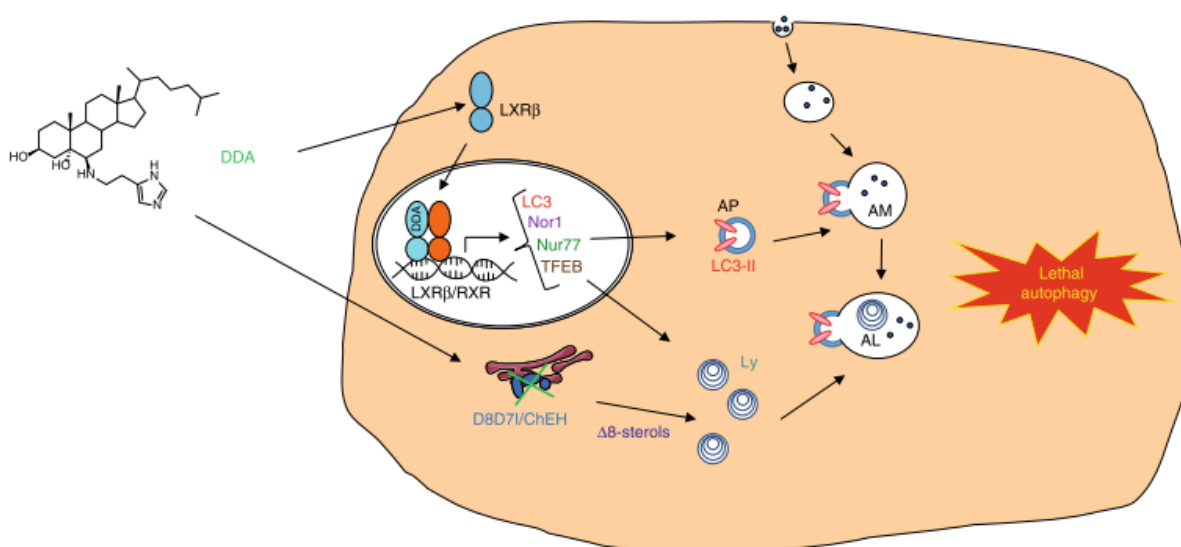


Figure 3. Scheme of the molecular mechanisms that lead to DDA induced lethal autophagy. Adapted from Segala, G. *et al.* (2017)¹⁷

3.3. 5,6-Epoxycholesterol

5,6 α - and 5,6 β -EC are important metabolites of cholesterol, present in various cellular processes as a substrate for ChEH and the precursors of the anticancer oxysterol DDA. ChEH hydrolyses 5,6 α - and 5,6 β -EC, the both forms of 5,6-EC, into cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT). The metabolism of this oxysterol is influenced by cancer disease, in particular, breast cancer (BC). Under this pathology, it has been recorded that DDA and 5,6-EC levels are decreased compared to other normal adjacent tissues and CT levels are increased, suggesting that ChEH plays a role in the progression of BC¹⁸. As such, being 5,6-EC the substrate of this hydrolase it is important to understand how its metabolism can interfere in BC progression and how drugs targeting the ChEH and AEBS, which carry out its activity, influence 5,6-EC concentration and what comes from its accumulation.

5,6-EC can be metabolized into a oncometabolite identified as the oxysterol OCDO. This happens through the metabolization of 5,6-EC into CT by the ChEH, and then CT is transformed into OCDO by the enzyme 11HSD2. The latter is known for regulating the glucocorticoid metabolism of active cortisol into cortisone. As such, OCDO has been shown to act upon BC by stimulating their growth and cell cycle progression, irrespective of their expression of ER α , by binding to the glucocorticoid receptor and LXRs. Since DDA and OCDO both originate from 5,6-EC metabolism, and their levels are different in normal tissue and BC, being DDA decreased in BC and OCDO increased, it can be inferred that there is a metabolic balance between the two 5,6-EC derivatives, that may influence BC progression. DDA inhibits OCDO, by inhibiting ChEH, so treatment with this oxysterol may compensate for its deficiency in BC. Additionally, ChEH inhibitors, such as Tamoxifen (Tam), which is a SERM, inhibiting ER α , also inhibits ChEH activity and OCDO production in both ER+ MCF7 and ER- MDA-MB231 cells, indicating that their action over this metabolic pathway is independent of ER α cancer cell expression. This means that Tam exerts an antiproliferative effect over ER- BC cells and can be a useful tool for their treatment¹⁸.

The close relation between ChEH and AEBS ligands has been described in a study by de Medina et al. (2010)⁹. It was evidenced that they are pharmacologically and molecularly related, as the substrates and product of the ChEH bind to AEBSs, competitively inhibiting Tam, and that ligands of AEBSs are inhibitors of ChEH. Using MCF-7 cells, it was demonstrated that there is a therapeutic value in the inhibition of ChEH, leading to the accumulation of ECs. Since ECs are autoxidation products of chol, overaccumulation induces differentiation and apoptosis in BC cells. However, antioxidants such as vitamin E can inhibit

these effects, suggesting that chol metabolism modulation is a key factor in the effectiveness of the therapy with Tam and other AEBS drugs⁹.

In study by Dalenc, F. *et al.* (2017)¹⁹, evaluated the feasibility of detecting and quantifying oxysterols in the blood of BC patients, treated with Tam and aromatase inhibitors (AI), a drug that blocks the formation of estrogens and androgens. Results showed that, overall, both 5,6 α - and 5,6 β -ECs concentrations increased in the whole studied population and no increase in their metabolites, CT and OCDO, was measured¹⁹.

AI treatment lead to an increase in 5,6 β -EC levels over 5,6 α -EC levels that remained unchanged as did the CT levels, thus suggesting that, to an extent, AI inhibits ChEH. This increase in the 5,6-EC level could also be associated with an increment in the oxidative stress, leading to auto-oxidation of chol to form 5,6-EC and other auto-oxidation products such as 7-KC, which also has a inhibitory effect over ChEH, futher increasing 5,6-EC accumulation. In patients treated with Tam, the concentration of 5,6-ECs, unexpectedly, didn't increase. This may be explained by the transformation of 5,6 α -EC into secondary products or bile acids. These secondary products can be sulfated derivatives of 5,6-EC, metabolized by SULT2B1b, producing 5,6 α -epoxycholesterol-3 β -sulphate (5,6 α -ECS), and this metabolite, in turn, contributes to Tam anticancer activity through a LXR-dependent mechanism. This is supported by the decrease of 24-OHC and 7 α -OHC, oxysterols that are formed by the action of CYP46 and CYP7A1, respectively, and whose transcription is directly or indirectly dependent on a LXR-dependent mechanism. Since the anticancer effect of Tam is mediated by the metabolization of 5,6-EC into 5,6-ECS and this oxysterol influences the concentration of 24-OHC and 7 α -OHC, these two oxysterols could be of importance to determine efficacy of Tam therapy.

To further understand the effect of Tam in exerting its anticancer effect in BC cells through the modulation of chol metabolism, a study by Leignadier, J. *et al.*(2017)²⁰ assessed the importance of SULT2B1b and LXR β on the sensitivity to Tam of MCF-7 BC cells (Figure 4 A), and how different KD combinations, MCF-7/LXR β - (Figure 4B), and MCF-7/SULT2B1b-(Figure 4 C), and of MDA-MB-231, which are triple negative BC cells due their insesibility to the proliferative action of 17 β -estradiol (Figure 4D) and a transgenic variation of this cell line expressing SULT2B1b, MDA-MB-231/SULT2B1b+ (Figure 4 E). The paths through which Tam induces its cytotoxic effect were named cytotoxic route 1 (CD1) which is linked to mitochondrial impairment by accumulation of 5,6 β -EC, and cytotoxic route 2 (CD2) which is caused by the conversion of 5,6 α -EC into 5,6 α -ECS by SULT2B1b, and its

agonist effect on LXR β nuclear receptor leading to cell differentiation and death. The results are summarized in the following figure²⁰.

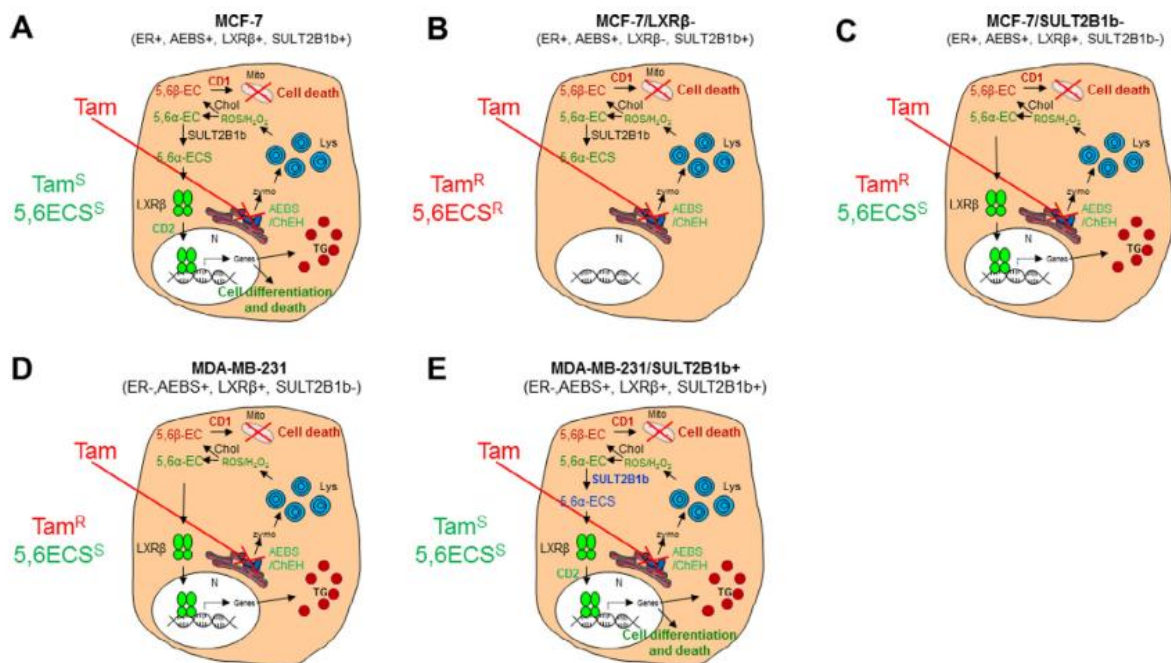


Figure 4. Sensitivity of MCF-7 BC cells and different KDs, and MDA-MB-231 and a transgenic variant to Tam and 5,6 α -ECS (5,6ECS). Adapted from Leignadier, J. *et al.* (2017)²⁰

A. MCF-7 cells are sensitive to Tam and 5,6 α -ECS and both CD1 and CD2 are observable;

B. MCF-7 cells with LXR β KD are less sensitive to Tam and other AEBS ligands, and 5,6 α -ECS, evidencing the pharmacological importance of these compounds. Only CD1 is observable.

C. MCF-7 cells with SUTL2B1b KD are Tam resistant, only exerting its anticancer effect through CD1. However, cells remain sensitive to 5,6 α -ECS which can reactivate CD2.

D. MDA-MB-231 cells are Tam resistant, exerting its effect through CD1, but remain 5,6 α -ECS sensitive, similarly to cells in C.

E. MDA-MB-231 transgenic cells, which express SULT2B1b, are both sensitive to Tam and 5,6 α -ECS, observing both CD1 and CD2. Their sensitivity to Tam is similar to the cells in A.

4. Modulation of oxysterol cytotoxicity through structural changes of cholesterol

Considering how endogenous oxysterols present chemotherapeutic properties, it is of interest to further explore this characteristic. Oxidized steroids with additional functional groups added to the ring system and side chain of oxysterols can further increase their potency and selectivity towards cancer cells. These derivatives are achieved by synthesizing these new molecules from the ones already found in Nature, adding new moieties such as, hydroxides, acetates, epoxides, phthalates, and heterocycles to different carbons of the steroid backbone. The cytotoxicity of these molecules is evaluated in human cancer and noncancer cells and structure-activity relationships (SAR) are analyzed. Thus, it becomes evident which functional groups, and in which position they enhance the molecules cytotoxic potential and how it affects their selectivity to cancer cells over noncancer cells.

4.1. Epoxysterols

Epoxides are three-membered cyclic ethers that react in specific reactivity patterns due to the presence of highly polarized oxygen-carbon bonds in a highly strained ring, participating in highly stereoselective reactions. In the chemical and pharmaceutical industry, enantiopure epoxides are useful as synthetic intermediates due to their synthetic versatility, acting as valuable intermediates for enantiocontrolled transformations. Several 4,5-epoxysterols are already used as intermediates in the synthesis of drugs such as AI and anti-HIV agents, and, by ring opening 5 α ,6 α -epoxysteroids contraceptives, anti-inflammatory agents and enzymatic inhibitors have been synthesized²¹.

To evaluate the cytotoxicity of synthetic epoxysterols, a library of epoxysterols was prepared by Carvalho *et al.* (2009)²¹ combining chemical and enzymatic methodologies: oxidization of unsaturated steroids with magnesium bis(monoperoxyphthalate) hexahydrate (MMPP) in acetonitrile, resulting in a mixture of cholestan-4,5-epoxides and cholestan-5,6-epoxides, and their separation in diastereomerically pure α - and β -epoxides using the lipases AY and Novozym435, by acylation/diacylation of a hydroxyl group close to the stereocenter. The molecules synthesized were then tested for cytotoxicity in human cancer cell lines HT29 (human colon cancer) and LAMA-84 (chronic myeloid leukemia in blast crisis) and noncancer cell line BJ (human foreskin fibroblast), and SARs were drawn from these results²¹.

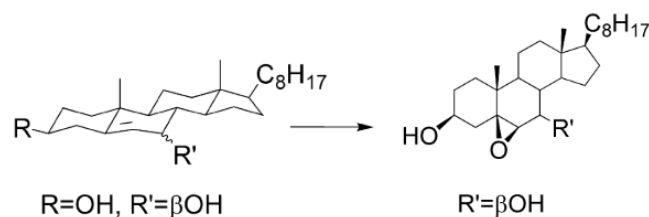


Figure 5. Synthesis of 5 β ,6 β -epoxycholestane-3 β ,7 β -diol from its oxysterol precursor. Adapted from Carvalho, J. et al. (2009)²¹.

The results showed that:

- Many of the epoxysterols synthesized showed cytotoxic activity at the micromolar level and in a dose-dependent manner²¹;
- In the case of nonsubstituted ring B Δ^4 - and Δ^5 -cholestenes, epoxidation lead, generally to an increase in cytotoxicity²¹;
- The stereoisomery of epoxides influences their biological activity, evidencing that β -epoxides are more cytotoxic than the corresponding α -epoxides²¹;
- The addition of a hydroxyl group in C-7, in the presence of an epoxide group, increases the cytotoxicity of the molecule²¹;
- The cytotoxic activity of epoxysterols is higher when the epoxide moiety is inserted in the ring B²¹.

Of the synthesized molecules, 5 β ,6 β -epoxycholestane-3 β ,7 β -diol demonstrated the highest cytotoxic potential and activity towards cancer cells (IC_{50} = 8.3 μ M in HT29 and IC_{50} = 7.0 μ M in LAMA-84).

In another study by Carvalho, J. et al. (2010)²² the epoxysterol 5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxycholestan-7-one was synthesized through modulation of a known oxidative procedure in an aqueous alkaline condition from 7-KC. Its precursor, which is moderately cytotoxic towards HT29 cells in a 48h period of incubation (IC_{50} = 25.7 \pm 1.0 μ M), originated 5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxycholestan-7-one which showed an almost 2-fold factor higher cytotoxicity, suggesting that the carbonyl moiety at C-7 when coupled with the α -epoxide group increased the toxic effect.

4.2. Ring B substituted steroidal pyrazoline derivatives

Recently, merged steroids with other unusual structures have been synthesized and their biological activity has been studied. Some of these molecules have exhibited anticancer activity, possibly acting upon multiple therapeutic targets and offer the possibility of overcoming certain drug resistance, as well as minimizing side effects and enable synergistic action with other anticancer drugs. As a part of these unusual structures, steroids condensed with heterocycles have shown to be of great interest for their anticancer potential, particularly pyrazoline derivatives².

In a study by Shamsuzzaman *et al.* (2013)² B-ring pyrazoline steroid derivatives were synthesized from steroidal α,β -unsaturated ketones by reacting under reflux with a mixture of dichloromethane/methanol (1:4) as solvent, and their cytotoxicity was tested in human cancer cell lines HeLa (cervical cancer cells) and Jukart (leukemia cells) and normal human cell line PBMC (peripheral blood mononuclear cells)². The results showed that:

- None of the compounds were cytotoxic towards human normal cells PBMC²;
- 3 β -Acetoxy-5 α -cholestane-[5,7-c d]-pyrazoline evidenced selectivity towards HeLa cells (IC_{50} = 15.3 \pm 0.3 μ M)²;
- 2'-Acetyl-5 α -cholestane-[5,7-c d]-pyrazoline evidenced selectivity towards Jukart cells (IC_{50} = 10.6 \pm 0.1 μ M)²;
- The substituent at the 3 β -position influences the activity of the molecules. An acetoxy group at the 3 β -position conveys greater activity when compared to H or Cl²;
- Groups attached to the N atom of the pyrazoline ring also influence the molecules activity. Bulky substituents reduced the biological activity of these molecules whereas Δ^5 derivatives were more active²;

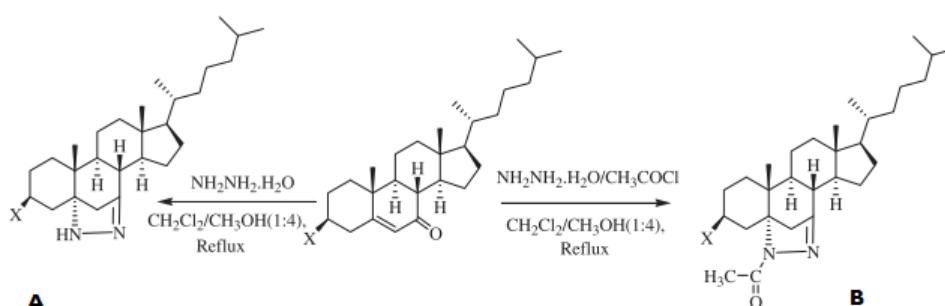


Figure 6. Synthesis of 3 β -acetoxy-5 α -cholestane-[5,7-c d]-pyrazoline (A, X=OAc) and of 2'-acetyl-5 α -cholestane-[5,7-c d]-pyrazoline (B, X=H). Adapted from Shamsuzzaman *et al.* (2013)².

4.3. Ring B modified oxysterols

The cytotoxic activity of endogenous and synthetic oxysterols is deeply related to its structural composition, and in particular the oxygenation of the sterol backbone ring B has been correlated with cytotoxicity towards human cancer cells²³. Oxysterols with the C-7 position oxidized (hydroxyl and carbonyl moieties) have been correlated to cytotoxic activity. In order to further the knowledge of ring B oxidized sterols cytotoxic activity, in a study by Carvalho *et al.* (2010)²² a library of oxysterols was synthesized and their cytotoxicity towards HT-29 human colon cancer cells was studied, and those exhibiting the best cytotoxic effect were further studied in a panel of cancer and noncancer cells.

The results showed that:

- The isomerism of the substituents affects the cytotoxic activity. When preparing 6 β -OHC, the stereochemistry of the hydroxyl group at C-6 showed that the β isomer is more potent than the α isomer by a 2-fold factor²²;
- Hemisuccinate derivatives from CT and 7-KC are almost as cytotoxic as their originating compounds²²;
- Phthalates, in particular sterols with a 6 β -hemiphthaloyl moiety don't change substantially the cytotoxicity of their originating compounds, due to the presence of a hydroxyl group in ring B, essential for membrane destabilization and cytotoxicity²².

4.4. Ring A modified oxysterols

As mentioned, some endogenous oxysterols have been reported to exert a cytotoxic effect, namely, oxysterols oxidized at C-7: 7-KC and 7 β -OHC. However, little was known of the biological activity of some endogenous oxysterols oxidized at C-4 (ring A), namely: 4 α -HC and 4 β -OHC. The latter is formed *in vivo* by the action of CYP3A4 and CYP3A5 over chol, while 4 α -OHC is a product of autoxidation. It is known that 4 β -OHC is a potent agonist of both LXR isoforms and thus can contribute to the regulation of various genes, however, their action over tumor and normal central nervous system (CNS) cells is unknown. To answer this question, in a study by Nury, T. *et al.* (2013)²⁴, both isoforms of 4-OHC were synthesized by an improved methodology and their anticancer activity towards immortalized, tumor and normal cells of the CNS, and their effects were compared to those of 7-KC and 7 β -OHC²⁴.

The results showed:

- Overall, the hydroxyl group at C-7 (ring B oxidized sterols) afforded a higher cytotoxicity²⁴;
- The hydroxyl group at C-4 (ring A oxidized sterols) had no cytotoxic, as the cell viability was not affected. Furthermore, the oxysterols had a more or less pronounced effect over cell proliferation on the immortalized or tumor CNS cells, thus suggesting a unique cytostatic property of 4-OHC isoforms, and no effect over cell proliferation in normal CNS cells²⁴.

4.5. Rings A and B modulation

The modification of both rings A and B in the cholestane backbone has been evaluated concerning its influence on cytotoxicity. It was observed that the endogenous CT has cytotoxic potential, however, another endogenous analog with a 6-oxo derivate, instead of a 6 β -OH is less potent. To assess the importance of the substitutes 5 α - and 6 β -OH, a study by Carvalho, J. *et al.* (2011)²³ evaluated the cytotoxicity of these oxysterols towards cancer cell line HT-29 and in normal cell ARPE-19.

The results showed:

- Substitution of the 6 β -OH by a methoxy group didn't significantly modify the cytotoxicity, however it increased the selectivity for cancer cells in 6 β -OMe²³;
- Bulky substituent groups at the 5 α -position reduced the activity of the compounds originated²³;
- An oxime derivate at the C-6 position showed higher cytotoxic activity when compared to the 6-oxo analogue, and a similar activity to 6 β substituents: -OMe and -acetamide²³.

5. Conclusion

The need for new and improved anticancer drugs propelled research of new natural and synthetic compounds, as to give answer to a demand of more potent drugs with less side effects and higher safety.

As byproducts of cholesterol oxidation, oxysterols are widespread in Nature, either in food, due to oxidation of cholesterol as a result of food processing and cooking, or as metabolites of cholesterol *in vivo*, through enzymatic and nonenzymatic pathways. As a result, oxysterols comprise a group of oxidized steroids, which interfere in several physiological processes, being ligands of cellular (ChEH and AEBs) and nuclear (LXR) receptors, promoting inflammation, atherosclerosis and influencing cancer progression.

It was observed that, in some conditions, oxysterols such as 27-OHC and 7-KC may promote carcinogenesis. In breast cancer, both oxysterols showed to promote cell proliferation, and, in the case of 27-OHC, increase metastasis. Thus, the regulation of the plasma levels of these oxysterols in breast cancer is deemed important. To achieve this, it would be of relevance to control the intake of cholesterol from diet, switching to a lower intake of cholesterol or using drugs such as statins that lower cholesterol synthesis in the liver by inhibiting HMG-CoA, as 27-OHC and 7-KC are both common products of cholesterol oxidation. Inhibition of CYP27A1, the enzyme that generates 27-OHC, is also favorable in lowering its plasma levels¹³.

However, the same oxysterol might have a cytotoxic effect towards a different cancer cell line, becoming a useful compound for chemotherapy, as in the case of 7-KC that in CML cells showed great potential to work around a multidrug resistance, that is recurrent in this disease, by inducing oxiaoptophagy, a cell death characterized by the activation of various pathways that lead to apoptosis. It also works as a chemotherapy sensitizer, by reducing the concentration needed of daunorubicin and vincristine to exert their cytotoxic effect.

Furthermore, other oxysterols show to exert their cytotoxic effect through different mechanisms. DDA induces lethal autophagy in melanoma and AML cells, by activating a LXR β -dependent pathway, which increase the formation of autolysosomes, and inhibiting D8D7I, part of the ChEH, leading to accumulation of its substrate Δ^8 -sterols, further increasing the autophagy in the cell.

5,6-Epoxycholesterols are key compounds in allowing a cytotoxic effect in the presence of drugs such as Tamoxifen. As a substrate of ChEH, 5,6-EC accumulation by using an AEBS ligand, which is also a ligand of ChEH, leads to the cell death and differentiation through a LXR mediated mechanism and transformation of 5,6-EC into 5,6-ECS by SULT2B1b results in mitochondrial impairment and cell death.

Given the good cytotoxic activity of endogenous oxysterols, analogues of these molecules were synthesized to achieve even more potent drugs and evaluate SARs to understand which substituents and in which position of the sterol backbone increase the molecules selectivity and cytotoxicity. The overall results showed that the presence of a hydroxyl group at C-3, C-5 and C-7 lead to increased cytotoxic activity, 5 β ,6 β - and 4 β ,5 β -epoxides were more cytotoxic than their α -epoxide counterparts, pyrazoline derivatives highly increase cytotoxicity, a phthalic substituent at C-6 with a hydroxyl group at C-7 constitute good cytotoxic activity, and ring B substituted molecules are overall more active than ring A substituted molecules, that have showed in the case of 4 α - and 4 β -OHC cytostatic effect, for the first time observed in oxysterols.

Given all the information gathered, oxysterols represent a group of diverse molecules with a common sterol backbone that present good biological activity, have demonstrated effective cytotoxicity towards a wide spectrum of cancer cells. So, it is important that they are further studied for their anticancer properties, leading to the synthesis of new molecules for chemotherapy, with a higher selectivity for cancer cells and more potent than the ones currently in use.

Bibliografia referente à Monografia

1. WHO. **Cancer Fact Sheet**. (2018) [Acedido a 30 de agosto de 2018] Disponível na internet: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. SHAMSUZZAMAN, KHANAM, H., MASHRAI, A., SHERWANI, A., OWAIS, M. and SIDDIQUI, N. **Synthesis and anti-tumor evaluation of B-ring substituted steroidal pyrazoline derivatives**. *Steroids* 78, (2013) 1263–1272
3. SALVADOR, J. A. R., CARVALHO, J. F. S., NEVES, M. A. C., SILVESTRE, S. M., LEITÃO, A. J., SILVA, M. M. C. and SÁ E MELO, M. L. **Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds**. *Nat. Prod. Rep.* 30, (2013) 324–374
4. KULIG, W., CWIKLIK, L., JURKIEWICZ, P., ROG, T. and VATTULAINEN, I. **Cholesterol oxidation products and their biological importance**. *Chem. Phys. Lipids* 199, (2016) 144–160
5. VURUSANER, B., LEONARDUZZI, G., GAMBA, P. and BASAGA, H. **Oxysterols and mechanisms of survival signaling**. *Mol. Aspects Med.* 49, (2016) 8–22
6. KLOUDOVA, A., GUENGERICH, F. P. and SOUCEK, P. **The Role of Oxysterols in Human Cancer**. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, (2017) 485–496
7. BARRIUSO, B., ANSORENA, D. and ASTIASARÁN, I. **Oxysterols formation: A review of a multifactorial process**. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169, (2017) 39–45
8. OUEDRAOGO, Z. G., FOUACHE, A., TROUSSON, A., BARON, S. and LOBACCARO, J.-M. A. **Role of the liver X receptors in skin physiology: Putative pharmacological targets in human diseases**. *Chem. Phys. Lipids* 207, (2017) 59–68
9. DE MEDINA, P., PAILLASSE, M. R., SEGALA, G., POIROT, M. and SILVENTE-POIROT, S. **Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, (2010) 13520–13525
10. LUCHETTI, F., CRINELLI, R., CESARINI, E., CANONICO, B., GUIDI, L., ZERBINATI, C., DI SARIO, G., ZAMAI, L., MAGNANI, M., PAPA, S. and IULIANO, L. **Endothelial cells, endoplasmic reticulum stress and oxysterols**. *Redox Biol.* 13, (2017) 581–587
11. ROSA-FERNANDES, L., MASELLI, L. M. F., MAEDA, N. Y., PALMISANO, G. and BYDŁOWSKI, S. P. **Outside-in, inside-out: Proteomic analysis of endothelial stress mediated by 7-ketocholesterol**. *Chem. Phys. Lipids* 207, (2017) 231–238

12. DEIANA, M., CALFAPIETRA, S., INCANI, A., ATZERI, A., ROSSIN, D., LOI, R., SOTTERO, B., IAIA, N., POLI, G. and BIASI, F. **Derangement of intestinal epithelial cell monolayer by dietary cholesterol oxidation products.** *Free Radic. Biol. Med.* 113, (2017) 539–550
13. BIASI, F. **Potential modulation of cancer progression by oxysterols.** *Mol. Aspects Med.* 49, (2016) 47–48
14. BAEK, A. E., YU, Y.-R. A., HE, S., WARDELL, S. E., CHANG, C.-Y., KWON, S., PILLAI, R. V., MCDOWELL, H. B., THOMPSON, J. W., DUBOIS, L. G., SULLIVAN, P. M., KEMPER, J. K., GUNN, M. D., MCDONNELL, D. P. and NELSON, E. R. **The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells.** *Nat. Commun.* 8, (2017) 864
15. WANG, C.-W. *et al.* **7-ketocholesterol and 27-hydroxycholesterol decreased doxorubicin sensitivity in breast cancer cells: estrogenic activity and mTOR pathway.** *Oncotarget* 8, (2017) 66033–66050
16. ROSA FERNANDES, L., STERN, A. C. B., CAVAGLIERI, R. DE C., NOGUEIRA, F. C. S., DOMONT, G., PALMISANO, G. and BYDLOWSKI, S. P. **7-Ketocholesterol overcomes drug resistance in chronic myeloid leukemia cell lines beyond MDRI mechanism.** *J. Proteomics* 151, (2017) 12–23
17. SEGALA, G. *et al.* **Dendrogenin A drives LXR to trigger lethal autophagy in cancers.** *Nat. Commun.* 8, (2017) 1903
18. VOISIN, M. *et al.* **Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, (2017) E9346–E9355
19. DALENC, F., IULIANO, L., FILLERON, T., ZERBINATI, C., VOISIN, M., ARELLANO, C., CHATELUT, E., MARQUET, P., SAMADI, M., ROCHÉ, H., POIROT, M. and SILVENTE-POIROT, S. **Circulating oxysterol metabolites as potential new surrogate markers in patients with hormone receptor-positive breast cancer: Results of the OXYTAM study.** *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169, (2017) 210–218
20. LEIGNADIER, J., DALENC, F., POIROT, M. and SILVENTE-POIROT, S. **Improving the efficacy of hormone therapy in breast cancer: The role of cholesterol metabolism in SERM-mediated autophagy, cell differentiation and death.** *Biochem. Pharmacol.* 144, (2017) 18–28

21. CARVALHO, J. F. S., CRUZ SILVA, M. M., MOREIRA, J. N., SIMÕES, S. and SÁ E MELO, M. L. **Efficient chemoenzymatic synthesis, cytotoxic evaluation, and SAR of epoxysterols.** *J. Med. Chem.* 52, (2009) 4007–4019
22. CARVALHO, J. F. S., SILVA, M. M. C., MOREIRA, J. N., SIMÕES, S. and SÁ E MELO, M. L. **Sterols as Anticancer Agents: Synthesis of Ring-B Oxygenated Steroids, Cytotoxic Profile, and Comprehensive SAR Analysis.** *J. Med. Chem.* 53, (2010) 7632–7638
23. CARVALHO, J. F. S., SILVA, M. M. C., MOREIRA, J. N., SIMÕES, S. and SÁ E MELO, M. L. **Selective Cytotoxicity of Oxysterols through Structural Modulation on Rings A and B. Synthesis, in Vitro Evaluation, and SAR.** *J. Med. Chem.* 54, (2011) 6375–6393
24. NURY, T., SAMADI, M., ZARROUK, A., RIEDINGER, J. M. and LIZARD, G. **Improved synthesis and in vitro evaluation of the cytotoxic profile of oxysterols oxidized at C4 (4 α - and 4 β -hydroxycholesterol) and C7 (7-ketocholesterol, 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol) on cells of the central nervous system.** *Eur. J. Med. Chem.* 70, (2013) 558–567