



Débora Gomes Arrais

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novas Estratégias Biomédicas: Modulação do Epigenoma e Terapia do Cancro” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Vera Soares, da Dra. Joana Ramos e do Professor Doutor João António Nave Laranjinha e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Débora Gomes Arrais

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novas Estratégias Biomédicas: Modulação do Epigenoma e Terapia do Cancro” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Vera Soares, da Dra. Joana Ramos e do Professor Doutor João António Nave Laranjinha e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Débora Gomes Arrais, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013153868, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novas estratégias biomédicas: modulação do epigenoma e terapia do cancro” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 4 de setembro de 2018.

Débora Gomes Arrais

(Débora Gomes Arrais)

AGRADECIMENTOS

O maior obrigada aos pais e ao Dinis pelas pessoas que são, pela paciência, amor e carinho, por estarem sempre do meu lado independentemente de tudo e por terem tornado isto possível.

Um obrigada a todos os amigos que estiveram lá quando foi preciso para ajudar, para criar as melhores memórias e tornar tudo ainda melhor.

Um obrigada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por me ter recebido e ter dado a melhor formação que poderia durante estes anos.

E por fim, um muito obrigada a Coimbra pelos anos inesquecíveis!

ÍNDICE

Relatório de Estágio – Farmácia Feliz

ABREVIATURAS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. ANÁLISE SWOT	4
2.1. PONTOS FORTES	4
2.1.1 Cedência de medicamentos a lares de idosos e centros de dia	6
2.1.2 Localização	7
2.1.3 Equipa técnica.....	7
2.1.4 Só um estagiário	7
2.1.5 Atendimento ao público	8
2.1.6 Serviços prestados	9
2.2 PONTOS FRACOS	9
2.2.1 Associação de nomes comerciais ao(s) respectivo(s) princípio(s) ativo(s).....	9
2.2.2 Conhecimento na área da dermofarmácia e cosmética; colírios	9
2.2.3 Carga horária do estágio	10
2.3 OPORTUNIDADES	10
2.3.1 Formações.....	10
2.3.2 Representante da marca Anjelif®.....	10
2.3.3 Medicamentos manipulados	11
2.4 AMEAÇAS	11
2.4.1 Medicamentos esgotados	11
2.4.2 Prescrição por DCI.....	12
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	12

Relatório de Estágio – Laboratórios Basi

ABREVIATURAS	13
RESUMO	13
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. ANÁLISE SWOT	13

2.1.	PONTOS FORTES	%
2.1.1	Ter passado por diferentes postos de trabalho	18
2.1.2	Aquisição de competências laboratoriais	20
2.2.	PONTOS FRACOS	&%
2.2.1	Distribuição do tempo pelos diferentes postos	21
2.2.2	Disponibilidade da equipa técnica	21
2.3.	OPORTUNIDADES	&&
2.3.1	Área das ciências farmacêuticas além da farmácia comunitária	22
2.3.2	Aplicar e aprofundar conhecimentos do MICF	22
2.4.	AMEAÇAS	&&
2.4.1	Poucos farmacêuticos no laboratório do Controlo de Qualidade	22
2.4.2	Cursos profissionais de 12º ano a desempenharem mesmas funções	23
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	&(

Monografia – Novas estratégias biomédicas: modulação do epigenoma e terapia do cancro

	ABREVIATURAS	&*
	RESUMO	&
	ABSTRACT	&-
1.	INTRODUÇÃO	\$
1.1.	Modificações pós-translacionais de histonas	30
1.2.	Metilação do DNA	32
1.3.	ncRNAs	34
2.	ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO CANCRO)
3.	FÁRMACOS BASEADOS EM MECANISMOS EPIGENÉTICOS)
3.1.	Inibidores epigenéticos de primeira geração	35
3.2.	Inibidores epigenéticos de segunda geração	38
3.3.	Proteínas reconhecedoras de marcas epigenéticas como alvo terapêutico	38
4.	RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA	-
5.	BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO	(%
5.1.	Marcas epigenéticas como biomarcadores no cancro	42
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	((
7.	BIBLIOGRAFIA	()

Relatório de Estágio



Orientado por:

Dr.^a Vera Soares

ABREVIATURAS

CNPEM – Código nacional para a prescrição eletrónica de medicamentos

DCI – Denominação comum internacional

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

RESUMO

O estágio curricular é a última etapa de uma formação de 5 anos conferida pelo Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. É a ligação entre a formação teórica adquirida até então e a realidade prática. Este relatório pretende explicar a minha experiência do estágio realizado na Farmácia Feliz em Mangualde sob a forma de uma análise SWOT. A análise SWOT divide as experiências vividas em Pontos fortes (*Strengths*); Pontos fracos (*Weaknesses*); Oportunidades (*Opportunities*); e Ameaças (*Threats*).

Palavras-chave: Farmácia Comunitária; Farmácia Feliz; Farmacêutico; utente; medicamentos.

ABSTRACT

The curricular internship is the last stage of a 5-year training conferred by the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. It is the link between the theoretical training acquired up until then and the practical reality. This report is meant to explain my experience from the stage held at *Farmácia Feliz* in *Mangualde* in the form of a SWOT analysis. The SWOT analysis divides the lived experiences in *Strengths*; *Weaknesses*; *Opportunities* and *Threats*.

Keywords: Community Pharmacy; *Farmácia Feliz*; Pharmacist; Patient; Drugs.

I. INTRODUÇÃO

O estágio curricular aparece no plano de estudos do MICF como uma última etapa destes 5 anos de formação e é imprescindível para aliar e sedimentar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo dos anos de faculdade à realidade prática.

A farmácia que escolhi para realizar o meu estágio foi a Farmácia Feliz, situada em Mangualde. Escolhi esta farmácia pela sua localização, uma vez que está localizada perto de onde moro e também porque sempre foi a farmácia de eleição da minha família e dado o profissionalismo sempre demonstrado achei que me iriam acolher da melhor maneira.

Relativamente à estrutura física da farmácia, podemos destacar em primeiro lugar a sala de atendimento ao público. Esta dispõe de 6 balcões para atendimento dos utentes, uma balança e um medidor de tensão arterial à disposição dos utentes, e um espaço destinado ao lazer das crianças. Atrás dos balcões de atendimento estão expostos essencialmente medicamentos não sujeitos a receita médica não acessíveis aos utentes e pela sala de atendimento estão dispostos outros produtos como cosméticos e produtos de higiene pessoal, produtos de puericultura, alimentação para fins específicos, perfumes, entre outros.

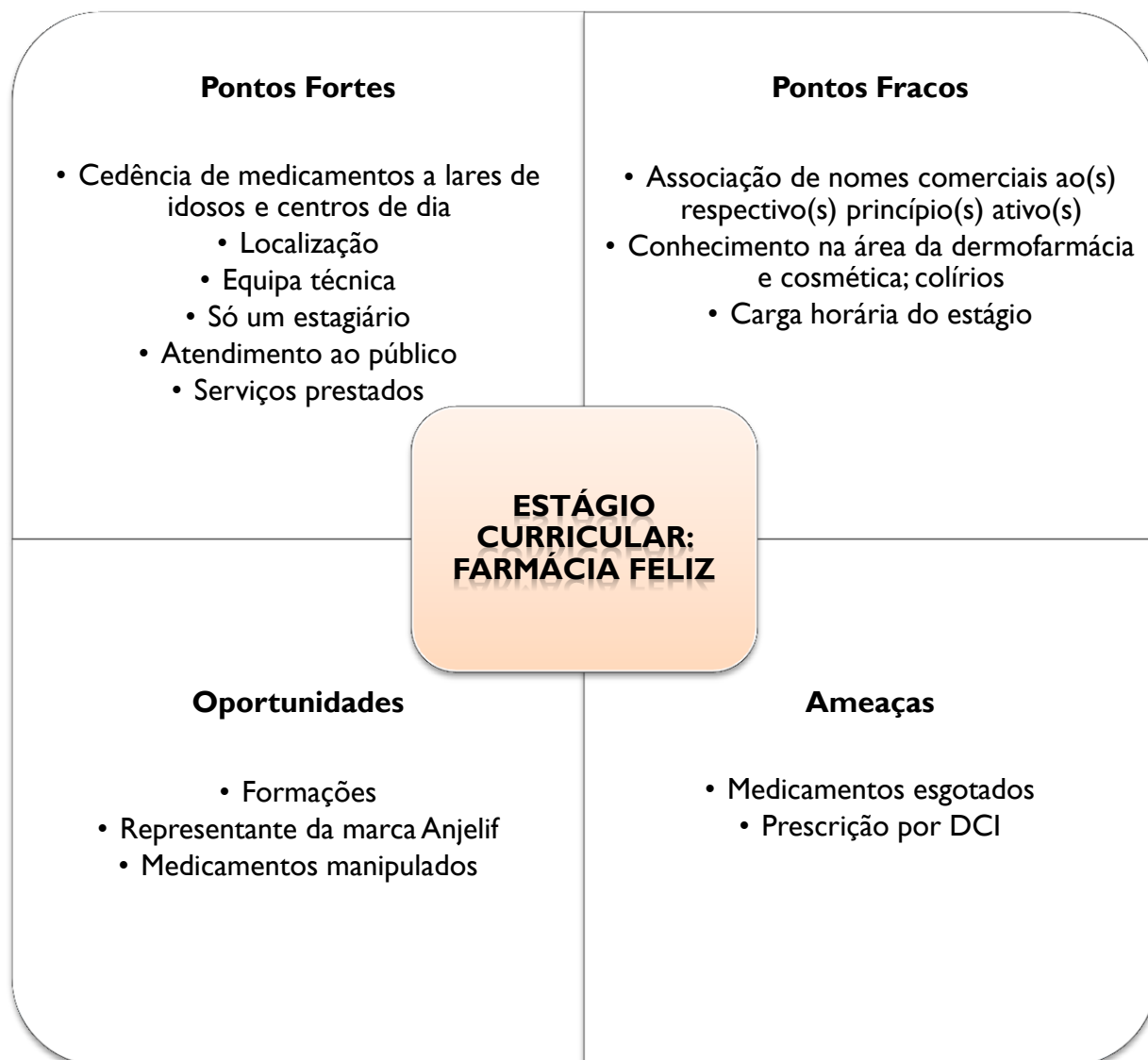
Deixando a sala de atendimento e passando para a área restrita à equipa técnica, logo atrás da zona dos balcões, mas separada por uma parede, encontramos as gavetas para arrumação de medicamentos e dois frigoríficos para armazenar medicamentos que requerem condições especiais de conservação a temperaturas mais baixas (de 2°C a 8°C). Os medicamentos estão ordenados por ordem alfabética de nome comercial, mas separados pela seguinte tipologia: medicamentos de aplicação tópica; medicamentos de venda livre; medicamentos de uso veterinário; colírios e preparações para uso oftálmico; dispositivos para controlo da glicémia (tiras-teste, agulhas e lancetas); medicamentos estupefacientes e psicotrópicos (estes estão arrumados em gavetas não identificadas e não acessíveis à vista do utente de nenhum ponto da sala de atendimento); medicamentos sujeitos a receita médica e, nas gavetas junto ao chão – formas farmacêuticas líquidas de maiores volumes (xaropes, suspensões, pós para suspensões orais, etc.) bem como embalagens de maiores volumes. Nas últimas semanas do meu estágio esta ordem sofreu alteração e os medicamentos sujeitos a receita médica passaram a estar ordenados por ordem alfabética de substância ativa, isto exigiu de mim capacidade de adaptação e permitiu um melhor reconhecimento dos medicamentos de marca e da substância ativa neles presentes, facto em falta durante o curso muito útil no dia-a-dia da farmácia.

A farmácia tem ainda um laboratório, um gabinete para atendimento personalizado, uma pequena sala para a receção de encomendas e ainda um armazém no andar inferior, destinado ao armazenamento de *stock* excedente de medicamentos que não cabem nas gavetas ou produtos que não têm espaço nos lineares.

A farmácia está aberta todos os dias úteis, das 8h30 às 20h e também aos Sábados e Domingos com horário de funcionamento mais reduzido, das 9h às 19h. Eu iniciei o meu estágio dia 8 de janeiro, no entanto, já tinha realizado anteriormente um estágio de verão nesta farmácia. Assim, nem tudo era novo para mim, uma vez que já conhecia os elementos da equipa técnica e já estava familiarizada com alguma da dinâmica da farmácia. Terminei o estágio dia 24 de abril.

2. ANÁLISE SWOT

Tabela 1: Análise SWOT do estágio em farmácia comunitária realizado na Farmácia Feliz



2.1. PONTOS FORTES

2.1.1. Cedência de medicamentos a lares de idosos e centros de dia

A Farmácia Feliz colabora com vários lares de idosos e centros de dia, fornecendo medicação e dispositivos médicos que são solicitados para os respetivos utentes.

Colaborar com a equipa técnica da farmácia nesta tarefa foi muito vantajoso para mim, uma vez que me permitiu começar a ter contacto com os medicamentos e produtos existentes na farmácia, interpretar a sua prescrição e familiarizar-me com a respetiva arrumação dos mesmos. Também me permitiu começar a ter alguma prática com o *software* informático da farmácia, Soft Reis®, e aprender a fazer vários procedimentos como vendas a

crédito, vendas suspensas, regularizações de vendas suspensas e recebimentos de clientes. Isto facilitou muito quando comecei a ir para o balcão fazer atendimento ao público pois já estava mais à vontade com o *software* e senti mais confiança.

2.1.2 Localização

A Farmácia Feliz está localizada na rua do Grémio, em Mangualde, em frente ao posto de Correios e ao lado de uma ourivesaria. Está próxima do centro da cidade, da Câmara Municipal de Mangualde e de uma Clínica médica. A farmácia é frequentada por utentes de diversas faixas etárias, mas predominam as pessoas idosas, sendo que a maioria dos utentes são fidelizados. A farmácia é frequentada tanto por pessoas da cidade de Mangualde como das diversas aldeias do concelho. É por isso uma farmácia bastante movimentada, o que me sensibilizou para as diversidades inerentes aos vários tipos de utentes que ocasionam tipos de atendimentos diferentes, com linguagem diferente e necessidades muito diferentes.

2.1.3 Equipa técnica

A equipa técnica da farmácia é constituída pela Diretora Técnica Dr.^a Maria Angélica Feliz; farmacêutica adjunta Dr.^a Vera Soares (orientadora de estágio); duas farmacêuticas; e mais nove elementos – técnicos de farmácia e auxiliares (uma técnica estava em estágio profissional e outra não esteve presente durante o meu estágio curricular pois estava em licença de maternidade).

Desde o início que todos os membros da equipa técnica se mostraram bastante receptivos e dispostos a qualquer tipo de ajuda e esclarecimentos de dúvidas que eu fui necessitando. Também constituiu uma vantagem o facto de a equipa ser grande, uma vez que esse facto me permitiu trabalhar com várias pessoas, aprendendo assim uma maior variedade de perspetivas bem como diferentes modos de abordar situações e tarefas a desempenhar na farmácia.

2.1.4 Só um estagiário

Durante todo o período do meu estágio curricular eu fui a única estagiária na mesma situação. No meu entender isso foi uma vantagem, pois enquanto estagiária, requeria muito tempo por parte da equipa técnica para aprendizagem de todo o tipo de tarefas realizadas na farmácia e esclarecimento de dúvidas. A ser a única estagiária estavam sempre mais disponíveis para o que fosse necessário. É de referir que, após a minha entrada no estágio,

houve também a entrada de uma pessoa para estágio profissional, mas a situação não era a mesma e eram-nos sempre atribuídas diferentes tarefas.

2.1.5 Atendimento ao público

O atendimento ao público foi algo que fui fazendo gradualmente e não comecei logo no início do estágio. Depois de ganhar alguma confiança nas tarefas realizadas fora do balcão fui transitando lentamente para o atendimento ao público. Inicialmente assistia aos atendimentos de alguma das farmacêuticas ou técnicos enquanto me iam explicando as várias etapas. Durante o atendimento questões como, dar a opção ao utente entre um medicamento genérico ou de marca quando fosse possível, informações relativas à toma e efeitos secundários da medicação prescrita, medidas não farmacológicas complementares ao tratamento, atendimentos que requeriam a avaliação e consequente resolução com indicações concretas ou envio para o médico foram acontecendo e sempre com o objectivo final da intervenção farmacêutica na melhoria da saúde pública, salvaguardando e garantindo que o utente não saía da farmácia com dúvidas a nenhum nível.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de contactar com os diferentes tipos de receitas medicamentosas: receitas manuais, receitas electrónicas em papel e receitas electrónicas desmaterializadas que nos chegavam na forma de guias de tratamento ou em SMS, sendo as receitas desmaterializadas substancialmente mais vulgares que as duas referidas anteriormente.

As receitas manuais embora não tenham aparecido com muita frequência, são as que exigem mais atenção e responsabilidade na dispensa. Na maioria das vezes tinha bastante dificuldade em conseguir ler quais os medicamentos que estavam a ser prescritos, para contornar esta dificuldade pedia sempre confirmação a mais algum elemento da equipa técnica para ter a certeza que estava a dispensar o(s) medicamento(s) correto(s) e também, tentava perceber junto à pessoa a quem estava a dispensar a medicação se sabia qual a medicação que lhe tinha sido prescrita ou para que fim esta se destinava e assim obter mais uma confirmação que não cometia um erro na dispensa. Para além disso, estas receitas requerem também bastante atenção para confirmar se, a prescrição está correta e todos os campos obrigatórios estão preenchidos. É vulgar aparecerem receitas manuais mal prescritas por parte dos médicos, com falta de alguma informação obrigatória ou erro na quantidade de medicamentos prescritos. Este tipo de receita tem ainda a dificuldade acrescida de que os medicamentos e o organismo de participação têm de ser introduzidos manualmente,

pelo que no final da venda não há confirmação dos medicamentos dispensados através do código de barras, ao contrário do que acontece nas receitas eletrónicas.

O atendimento ao público foi onde senti mais dificuldades, é onde somos mais postos à prova dos conhecimentos adquiridos até então, mas também é o sítio onde podemos aprender mais, interagir mais e entrar na cadeia como promotor e agente de saúde pública.

2.1.6 Serviços prestados

A farmácia Feliz permite a medição de vários parâmetros bioquímicos e fisiológicos, e enquanto estagiária tive a oportunidade de efectuar alguns deles, medição da glicémia, medição de colesterol total, medição de triglicéridos e também tensão arterial. Estes testes são realizados num gabinete de atendimento personalizado para garantir a privacidade dos utentes. Penso que as medições destes parâmetros são uma grande oportunidade de aconselhamento farmacêutico, é um momento de maior proximidade com o utente onde podemos estimular o utente a estilos de vida saudável, aconselhar medidas não farmacológicas e também adesão à terapêutica no caso de utentes já medicados, ou encaminhamento para o médico se tal for aconselhável.

2.2 PONTOS FRACOS

2.2.1 Associação de nomes comerciais ao(s) respectivo(s) princípio(s) ativo(s)

Associar os nomes comerciais dos medicamentos ao respectivo princípio ativo foi uma das maiores dificuldades que senti, principalmente nos primeiros tempos de atendimento ao balcão. Ao longo do curso fomos habituados a falar sempre nos princípios ativos e no dia-a-dia da farmácia a realidade não é a mesma, pois muitos utentes apenas mencionam os nomes comerciais e as receitas eletrónicas vêm prescritas por DCI, pelo que era difícil no início conseguir associar o medicamento pedido à prescrição. No entanto com o tempo, tornou-se cada vez mais fácil, ao arrumar os medicamentos e mesmo ao vender fui progressivamente associando o princípio ativo ao nome do medicamento bem como à imagem da própria caixa o que por vezes também se torna muito útil. Para além disso, o *software* informático constitui uma ajuda nesse aspeto porque é possível ver para determinado CNPEM todas as alternativas disponíveis, incluindo o medicamento de marca, de forma rápida.

2.2.2 Conhecimento na área da dermofarmácia e cosmética; colírios

Com o começar do atendimento ao público começaram a surgir as maiores dúvidas e inseguranças pois aí era realmente testada sobre o que teria aprendido até então. Ao longo

do estágio as áreas onde senti mais dificuldade foram, dermofarmácia e cosmética, embora tenhamos tido uma unidade curricular sobre isso não foi suficiente pois é uma área muito grande e complexa e sempre em rápida evolução.

Outra grande dificuldade que encontrei foi nos colírios, pois existe uma grande variedade de preparações para uso ocular com as mais variadas indicações associadas. Senti-me mais limitada, uma vez que este tópico foi muito pouco abordado ao longo do curso.

2.2.3 Carga horária do estágio

A faculdade estipula o mínimo de horas para o estágio curricular em farmácia comunitária e a farmácia deu-me a total liberdade para a escolha do meu horário. É de valorizar no entanto a hipótese da realização de estágios noutras áreas do medicamento que não a farmácia comunitária pela faculdade, o que considero uma excelente oportunidade, mas que acaba por limitar e sobrecarregar o período para a realização do estágio em farmácia comunitária obrigando a uma maior carga horária semanal.

Penso que se pudesse ter feito um horário com mais horas livres teria mais interesse pedagógico no sentido que não era tão cansativo, o tempo seria melhor aproveitado e teria mais tempo livre para realizar pesquisas e trabalhos fora da farmácia.

2.3 OPORTUNIDADES

2.3.1 Formações

Ao longo do estágio tive a oportunidade de realizar várias formações, tanto dentro da farmácia pela visita de delegados de informação médica, mas também em formações realizadas fora da farmácia, nomeadamente: sobre produtos de algumas gamas da *Isdin*[®] e FAMA “Farmácia e o Aconselhamento à Mulher em Atendimento”- Contraceção e acne promovida pela *Gedeon Richter*[®].

Estas formações são uma excelente oportunidade para melhorar o conhecimento dos produtos ou medicamentos encontrados na farmácia e esclarecimento de dúvidas acerca deles e assim promover um melhor aconselhamento aos utentes no momento da sua dispensa.

2.3.2 Representante da marca Anjelif[®]

A Farmácia Feliz recebe frequentemente outros profissionais para proporcionar outros serviços aos utentes como, consultas de nutrição, podologia, realização de rastreios capilares

e aconselhamentos na área da cosmética. Enquanto estagiária tive a oportunidade de realizar uma limpeza de pele promovida por uma representante da marca Anjelif[®], que me permitiu ficar a conhecer alguns produtos para o meu tipo de pele bem como todas as outras gamas para os diferentes tipos de pele, ferramenta útil para o aconselhamento desse tipo de produtos no atendimento.

2.3.3 Medicamentos manipulados

Embora os medicamentos manipulados sejam cada vez menos solicitados, devido ao avanço da indústria farmacêutica, a Farmácia Feliz ainda executa medicamentos manipulados quando aparecem prescrições para eles. Os medicamentos manipulados permitem responder a necessidades individuais quando os medicamentos comercializados não o permitem. Ao longo do estágio tive a oportunidade de assistir e ajudar à preparação de vários manipulados como, pomada composta de ácido salicílico mais Dermovate[®] pomada mais vaselina sólida; álcool a 70° saturado com ácido bórico mais água oxigenada; suspensão oral de Trimetoprim[®] a 1%, bem como ao preenchimento da ficha de preparação de manipulados e a rotulagem do mesmo. Nesta ficha ficam registados os lotes e respectivas quantidades de cada reagente utilizado, os procedimentos utilizados para a sua preparação e informação do utente e médico prescriptor e cálculo do seu preço pela respetiva fórmula. Procedemos também à execução do rótulo que identifica o respectivo manipulado, contém a validade, condições de conservação e considerações importantes (Manter fora do alcance e da vista das crianças, uso externo se for o caso, etc.).

2.4 AMEAÇAS

2.4.1 Medicamentos esgotados

A gestão de *stocks* na farmácia é um processo fulcral para o bom funcionamento da mesma. No entanto há problemas cuja resolução ultrapassa a própria farmácia, nomeadamente quando medicamentos ficam esgotados nos fornecedores, o que acaba por ser uma ameaça à relação farmacêutico-utente bem como um problema de saúde pública, uma vez que muitos deles não têm alternativa e o envio para o médico para alteração nem sempre consegue fazer em tempo acessível. Infelizmente esta foi uma situação frequente com vários tipos de medicamentos que por vezes ficavam esgotados por longos períodos de tempo.

2.4.2 Prescrição por DCI

A prescrição feita por DCI nas receitas eletrônicas foi outro fator que representou um teste à relação farmacêutico-utente. A prescrição por DCI permite que a opção entre a aquisição de um medicamento genérico ou de marca seja da total responsabilidade do utente, no entanto, ainda há muita desconfiança e falta de conhecimento da parte da população acerca dos medicamentos genéricos, da variabilidade de preços verificados e da sua relação com a qualidade dos mesmos. Foram inúmeras as vezes que quando questionava o utente se pretendia levar um medicamento de marca ou um genérico ele apenas respondia que queria o medicamento que estava na receita, não queria o de marca nem o genérico, queria o que estava na receita, coisa que não era possível uma vez que ele está por DCI.

Este tipo de situação se não for bem explicada e gerida pode muito facilmente ocasionar desconfiança por parte do utente.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular foi o culminar destes 5 anos de formação enquanto estudante da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Foram meses de aprendizagem constante, algo novo a cada dia, crescimento não só a nível académico, mas também pessoal.

O farmacêutico é o profissional de saúde mais próximo da população, tem um papel fulcral na promoção de bons hábitos de saúde e bem-estar e na garantia do uso racional do medicamento. É uma grande realização pessoal saber que estou no final desta etapa e a um passo de me tornar um agente interveniente e ativo na promoção de saúde e bem-estar da comunidade.

Por fim, resta-me agradecer a toda a equipa da Farmácia Feliz pelo profissionalismo, conhecimentos, companheirismo e disponibilidade que sempre demonstraram ao longo do estágio.

Relatório de Estágio



Orientado por:

Dr.ª Joana Ramos

ABREVIATURAS

5-hmf – 5-hidroximetilfurfural

IPC – *In Process Control*

IV – Infravermelho

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PEG 400 – Polietilenoglicol 400

RH – Humidade Relativa

RESUMO

O farmacêutico não está só presente na farmácia comunitária, mas em todas as etapas do medicamento e portanto é importante que a formação incida em todas essas áreas. Tive a oportunidade de realizar um estágio em indústria farmacêutica além do estágio em farmácia comunitária, único que é obrigatório no plano curricular do MICE. Este relatório pretende explicar a minha experiência do estágio realizado nos laboratórios Basi, em Mortágua, sob a forma de uma análise SWOT. A análise SWOT divide as experiências vividas em Pontos fortes (*Strengths*); Pontos fracos (*Weaknesses*); Oportunidades (*Opportunities*); e Ameaças (*Threats*).

Palavras-chave: Laboratórios Basi; Indústria farmacêutica; Farmacêutico; Controlo de Qualidade; Laboratório; Estudos de Estabilidade.

ABSTRACT

The pharmacist is not only present in the community pharmacy, but in all drug stages and therefore it is important that the training focuses on all these areas. I had the opportunity to undertake an internship in the pharmaceutical industry beyond the internship in community pharmacy, which is the only mandatory in the curricular plan of the MICE. This report is meant to explain my experience from the stage held at *Laboratórios Basi* in *Mortágua* in the form of a SWOT analysis. The SWOT analysis divides the lived experiences in *Strengths*; *Weaknesses*; *Opportunities* and *Threats*.

Keywords: *Laboratórios Basi*; Pharmaceutical Industry; Pharmacist; Quality Control; Laboratory; Stability Studies.

I. INTRODUÇÃO

Embora o farmacêutico seja na maioria das vezes apenas associado à Farmácia comunitária essa não é a realidade. O farmacêutico é o especialista do medicamento e está portanto, presente em todas as suas etapas desde o seu desenvolvimento, produção, controlo, distribuição até à dispensa. É por isso importante que a formação incida em todas estas etapas.

No plano curricular do MICF apenas o estágio em farmácia comunitária é obrigatório, no entanto, desde muito cedo que tive a curiosidade de poder experimentar e aprender mais sobre outra área do medicamento além da farmácia comunitária.

A indústria farmacêutica sempre foi a área farmacêutica que me despertou mais curiosidade e por isso quando cheguei ao 5º ano soube que iria querer fazer um estágio também em indústria.

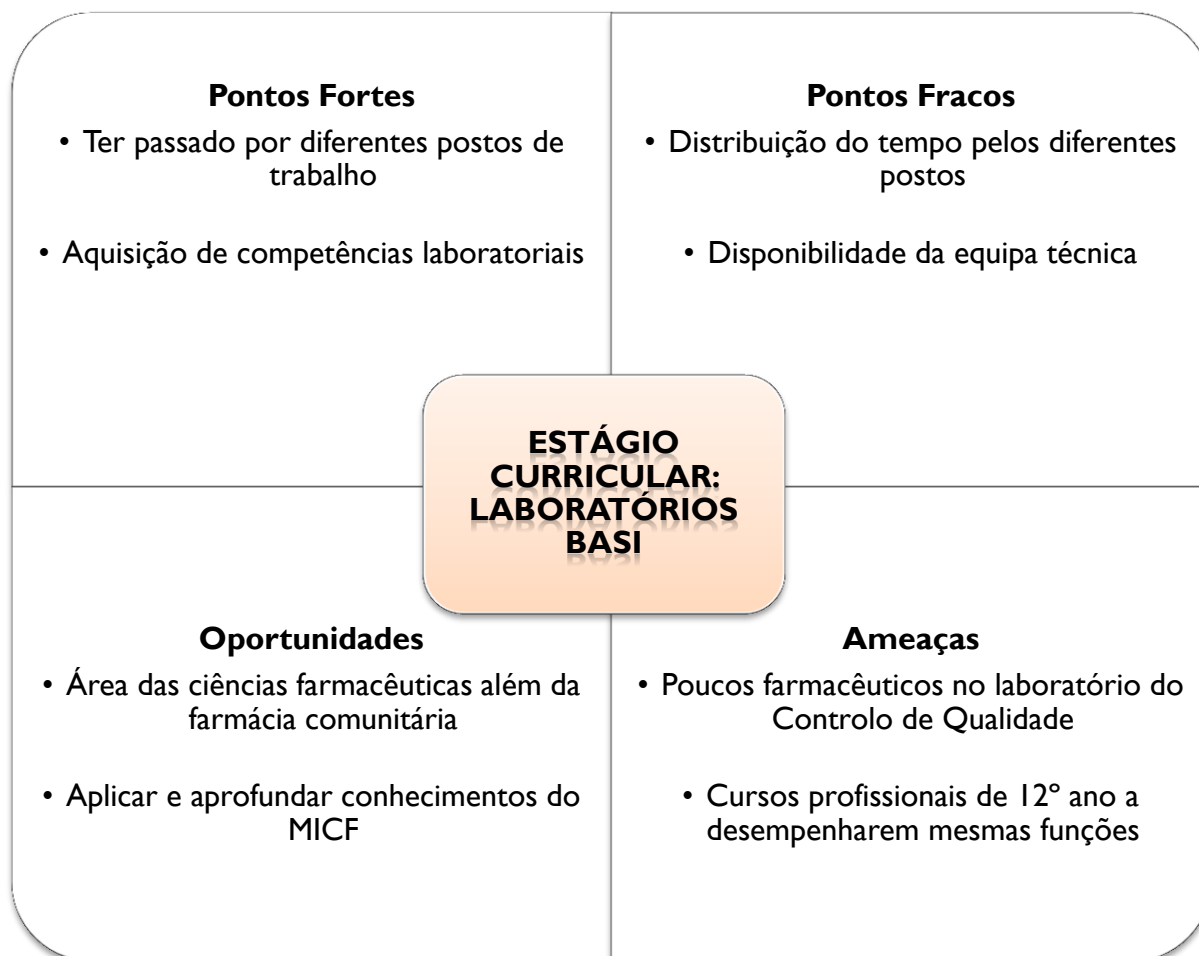
Realizei o meu estágio no departamento de Controlo de Qualidade dos laboratórios Basi, situados na zona industrial de Mortágua. O estágio decorreu de 2 de maio a 3 de agosto.

Relativamente à estrutura física das zonas que frequentei durante o meu estágio, há um corredor que dá acesso às diferentes áreas, por exemplo, à sala de receção de amostras, aos laboratórios (laboratório de Microbiologia e laboratório físico-químico), uma sala de reuniões e aos escritórios onde, entre outros, se encontram os responsáveis pelo laboratório e pelo departamento do Controlo de Qualidade.

Os laboratórios Basi estão integrados no grupo FHC farmacêutica, do qual fazem parte também, Paracélsia, Overpharma, Empifarma, Phagecon e Zeone.

2. ANÁLISE SWOT

Tabela 2: Análise SWOT do estágio curricular em indústria farmacêutica realizado nos Laboratórios Basi.



2.1. PONTOS FORTES

2.1.1. Ter passado por diferentes postos de trabalho

Inicialmente o meu estágio começou por ser no laboratório físico-químico. No laboratório cada analista tem uma função atribuída, por exemplo, há analistas responsáveis pelo controlo de qualidade de matérias-primas, outros são responsáveis pelo produto acabado, controlo de acondicionamento primário, secundário e folhetos informativos, há analistas responsáveis pelos estudos de estabilidade e há ainda o controlo em processo (IPC).

No laboratório fui acompanhada por uma analista responsável pelo controlo do produto acabado de estéreis, apesar destes não serem fabricados nos Basi. A maioria dos produtos que chegam para análise são soros, mas também chegam por vezes antibióticos para administração parenteral. Os produtos que tive a oportunidade de analisar enquanto

estagiária foram: soro fisiológico; solução polieletrolítica simples e solução polieletrolítica com glucose; Soluções de glucose e soluções de glucose com cloreto de sódio (sendo que há formulações com diferentes concentrações de ambos os componentes) e ainda levofloxacina.

Os principais testes feitos aos estéreis são: contagem de partículas (número de partículas maiores que 10 μm e número de partículas maiores que 25 μm); pH; identificações e doseamentos dos princípios ativos; volumes e densidades. Há ainda alguns testes mais específicos de cada produto, por exemplo nas soluções de glucose é feito um teste de doseamento do 5-hmf (5-hidroximetilfurfural) um produto de degradação da glucose. Alguns procedimentos são bastante semelhantes para os diferentes produtos, no entanto outros, nomeadamente as identificações e doseamentos são específicos de cada produto em função das substâncias ativas presentes.

Poucas semanas depois do início do meu estágio foram-me atribuídas outras tarefas, saí então do laboratório e passei para a parte da documentação referente aos estudos de estabilidade. Estudos de estabilidade podem ter diferentes objetivos, determinar prazos de validade por extrapolação, garantir que o produto continua estável após alguma alteração no fabrico como, alteração do local de fabrico da substância ativa, alteração de alguma especificação ou algum excipiente, etc. e garantir que o produto continua estável durante todo o período da sua comercialização. Os estudos de estabilidade são feitos em amostras de lotes armazenadas sob diferentes condições: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% RH \pm 5% RH; $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% RH \pm 5% RH; $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% RH \pm 5% RH e $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% RH \pm 5% RH. Estas amostras são depois analisadas em vários pontos no tempo ao longo do tempo de estudo (geralmente os tempos de estudo são de 24, 36 ou 60 meses, no entanto, para a condição de temperatura de 40°C , 75% RH são normalmente mais curtos, 6 meses, uma vez que a degradação é mais acelerada). A cada produto é-lhe atribuído um protocolo de estabilidade onde estão descritas as condições do estudo, o tempo de estudo e os tempos de análise, bem como as análises que serão feitas em cada tempo.

Nas estabilidades fiz várias tarefas diferentes como, organizar e arquivar resultados de estabilidade, preencher informaticamente tabelas de estabilidade que contêm os resultados de cada análise nos respectivos tempos de estudo, elaboração de gráficos com os resultados dos ensaios para ver a evolução ao longo do tempo de estudo de determinada característica (pH, viscosidade, densidade, doseamentos de substâncias ativas, conservantes ou impurezas

são alguns exemplos, quando aplicáveis), elaboração de novas tabelas para produtos que iriam iniciar o seu estudo de estabilidade, etc.

Além do laboratório e das estabilidades estive ainda alguns dias na recepção de amostras, aqui é um ponto intermediário entre a produção e o controlo de qualidade. As amostras a analisar chegam a esta sala, dá-se entrada no *software* de gestão e são etiquetadas. As etiquetas contêm a identificação do nome do produto (pode ser todo o tipo de amostras – produto acabado, matérias-primas, cartonagens, etc.), lote e o fim a que se destinam. As amostras chegam da secção da produção dos laboratórios Basi, mas também chegam de fora. Após etiquetadas são entregues aos respectivos laboratórios, físico-químico ou de microbiologia, juntamente com uma ordem de análise. A ordem de análise é um documento que contém os ensaios a serem feitos àquela amostra, bem como o método a seguir e respetiva especificação que respeita que irá ser preenchido pelo analista com os resultados da análise.

Em muitos dos meus dias alternei entre estas diferentes actividades. Também no laboratório tive a oportunidade de realizar outras análises além dos estéreis. Fiz alguns ensaios a matérias-primas (por exemplo, cloreto de potássio, cloreto de sódio, PEG 400, vaselina branca, etc.) e também alguns ensaios de análise de águas. A análise de águas é um ensaio feito diariamente a amostras de águas recolhidas de diferentes pontos de água purificada no laboratórios Basi que é utilizada para diferentes fins, como matéria-prima para a produção de alguns medicamentos, para lavagem dos equipamentos da produção e para as próprias análises e é por isso imprescindível que seja verificada a sua qualidade diariamente. Além da água purificada são também feitos alguns ensaios a amostras de água ainda não purificada. Dos vários ensaios que são realizados diariamente tive a oportunidade de realizar, condutividade, pH, substâncias oxidáveis, nitratos e metais pesados e ainda dureza total e cloro livre e total para as águas não purificadas.

2.1.2. Aquisição de competências laboratoriais

Penso que um dos maiores enriquecimentos a nível profissional e académico que retirei deste estágio foi a experiência a nível laboratorial. O MICF proporciona-nos uma vasta formação a nível laboratorial, são inúmeras as unidades curriculares com vertente laboratorial que temos ao longo dos primeiros 4 anos do curso e nas mais diversas áreas, o que considero ter sido uma mais valia no meu dia a dia de estágio. No entanto, na faculdade o tempo das aulas laboratoriais é curto o que limita certos procedimentos, muitas vezes não

realizávamos procedimentos completos pois o tempo de uma aula laboratorial não era suficiente e apenas fazíamos parte do protocolo.

Tive também a oportunidade de usar vários equipamentos, alguns dos quais não tinha contactado antes, por exemplo, contador de partículas (na análise de estéreis), polarímetro (para doseamento da glucose) e espectrómetro de IV (para identificação de várias matérias-primas).

2.2. PONTOS FRACOS

2.2.1. Distribuição do tempo pelos diferentes postos

Apesar de ter sido vantajosa a minha passagem por diferentes postos de trabalho no Controlo de Qualidade, penso que a distribuição de tempo em cada uma delas não foi a mais vantajosa. Por vezes estava pouco tempo com determinada actividade e tinha de aprender muito rapidamente para conseguir executar da melhor maneira. A ausência de um plano de estágio acabou por tornar confusos alguns dos meus dias enquanto estagiária e impediu-me de poder retirar a maior aprendizagem que poderia ter retirado.

2.2.2. Disponibilidade da equipa técnica

A indústria farmacêutica é um ambiente muito complexo, todos os colaboradores têm planos para cumprir e na maioria das vezes com prazos muito apertados. Para além disso nem sempre tudo se pode planear com muita antecedência, pelo que a boa gestão do tempo é fulcral. Tudo isto torna um pouco difícil que seja dispensado muito tempo junto dos estagiários. Apesar de sempre ter sido bem recebida por toda a equipa e todos se mostrarem disponíveis para esclarecimento de dúvidas quando assim o procurava, o tempo dispensado nunca poderia ser muito pois havia essa falta de tempo. Por vezes senti falta de enquadramento nas atividades que executava e só com o tempo e observação vinha a compreender melhor como as coisas aconteciam. Enquanto estagiária tive que demonstrar sempre grande independência e autonomia nas tarefas propostas, logo desde início. Penso que isso também tenha prejudicado a possibilidade de retirar o máximo de aprendizagem que poderia ter retirado em todo o tempo de estágio.

2.3. OPORTUNIDADES

2.3.1. Área das ciências farmacêuticas além da farmácia comunitária

O farmacêutico é um profissional multidisciplinar e a sua intervenção na sociedade incide numa grande diversidade de áreas. O MICF tem uma formação bastante abrangente direccionada para todas as áreas das ciências farmacêuticas, no entanto, relativamente ao estágio curricular apenas há obrigatoriedade para estágio em farmácia comunitária. Considero portanto uma mais valia para a minha formação ter tido a oportunidade de realizar um estágio também em indústria farmacêutica. Pude ganhar novas competências e conhecimentos e sinto que obtive assim uma formação mais rica e abrangente.

2.3.2. Aplicar e aprofundar conhecimentos do MICF

Ao longo do estágio foram inúmeras as vezes que cruzei com a abordagem de conteúdos programáticos de várias unidades curriculares do MICF. Destaco, Tecnologias farmacêuticas; Métodos instrumentais de análise; Química analítica; Químicas farmacêuticas e todas as unidades curriculares que me tenham conferido competências a nível laboratorial. Também Gestão e Garantia de Qualidade; Assuntos Regulamentares do medicamento, por exemplo quando trabalhei mais na área das estabilidades, estudos de estabilidade foram abordados nesta unidade curricular, mas de maneira muito superficial e ao longo do estágio foi um dos conhecimentos que pude aprofundar bastante relativamente ao que foi abordado nas aulas.

Senti portanto que foi uma excelente oportunidade para fazer a ligação de todos os conhecimentos adquiridos ao longo do curso com a realidade prática no contexto de trabalho.

2.4. AMEAÇAS

2.4.1. Poucos farmacêuticos no laboratório do Controlo de Qualidade

Sendo o farmacêutico o especialista do medicamento e a indústria uma etapa com tanta relevância no percurso do medicamento esperaria encontrar uma significativa quantidade de farmacêuticos neste sector. No entanto, foi uma grande surpresa para mim quando me apercebi que, principalmente no laboratório do Controlo de Qualidade a quantidade de farmacêuticos é uma minoria muito grande. Há analistas com variadas formações e elevadas competências a nível laboratorial, no entanto a nível farmacêutico isso não se verifica.

2.4.2. Cursos profissionais de 12º ano a desempenharem mesmas funções

Quando iniciei o meu estágio no laboratório apercebi-me que havia mais estagiárias além de mim também no laboratório e vim a aperceber-me que completavam um curso profissional de ensino secundário. Para além das estagiárias existem analistas também com igual formação. Como finalista do MIF e futura farmacêutica considero uma grande ameaça à profissão. O curso proporciona-nos formação específica na área do medicamento onde se inclui a indústria farmacêutica, a produção e controlo de qualidade de medicamentos e a nossa presença não é tão marcada como esperava.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após estes anos de formação proporcionada pelo MICF o estágio curricular é o culminar desta formação, é o que permite aliar os conhecimentos teóricos à realidade prática e formar profissionais aptos para entrar no mercado de trabalho.

O Controlo de Qualidade é a garantia que os produtos que a indústria faz chegar à população tem a qualidade necessária e o que permite que os utentes confiem na indústria farmacêutica.

Foram três meses de muita aprendizagem, experiências novas, competências novas. Depois do estágio em farmácia comunitária ir para a indústria foi entrar e conhecer uma realidade completamente diferente. Foi por isso uma grande mais valia para a minha formação académica. Foi uma experiência muito enriquecedora aos mais diversos níveis, académicos e também pessoais.

Com isto, quero agradecer aos laboratórios Basi por me terem recebido como estagiária, a toda a gente que contribui para a minha integração e me recebeu da melhor maneira, pela experiência proporcionada e por tudo o que pude aprender e conhecer de novo. Espero levar a melhor bagagem para o futuro para poder representar a profissão da melhor maneira possível.

MONOGRAFIA

Novas estratégias biomédicas: modulação do epigenoma e terapia do cancro



Orientada por:

Professor Doutor João Laranjinha

ABREVIATURAS

5caC – 5-carboxilcitosina

5fC – 5-formilcitosina

5-FU – 5-fluorouracil

5hmC – 5-hidroximetilcitosina

5mC – 5-metilcitosina

ABC – *ATP-binding cassette*

ADP – Adenosina difosfato

BER – reparação por excisão de bases

BET – *bromodomain and extra terminal*

BRD – *bromodomain family*

CpG – citosina-fosfato-guanina

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNMT – DNA metiltransferase

DNMTi – inibidor(es) das DNMT's

HAT – acetiltransferases das histonas

HDAC – deacetilase das histonas

HDACi – inibidor(es) das HDAC's

LMA – leucemia mielóide aguda

lnRNA – *long non coding RNA*

MBT – malignant brain tumor

MDR – *Multi drug resistance*

miRISC – *miRNA induced silencing complex*

miRNA – micro RNA

ncRNA – RNA não codificante

PHD – *plant homeodomain fingers*

PWWP – prolina-fosfato-fosfato-prolina

RNA – ácido ribonucleico

SAM – s-adenosilmetionina

TDG – timina DNA glicosilase

TET – *ten eleven translocation*

RESUMO

A epigenética pode ser definida como mecanismos que modulam a expressão genética sem alterar a sequência primária de DNA. Os três principais grupos de alterações epigenéticas que podemos enumerar são a modificação química das bases do DNA, nomeadamente a metilação do DNA por adição de um grupo metilo ao quinto carbono de uma citosina, reação esta que é catalisada pelas DNMT's; modificações pós-translacionais de histonas e RNAs não codificantes, sendo os mais relevantes os miRNAs. O epigenoma de cada indivíduo não é, assim, constante ao longo da nossa vida, podendo ser alterado pela dieta, pelo metabolismo, ambiente, xenobióticos e, também por doença, como acontece no cancro. Com base nesse conhecimento foram desenvolvidos fármacos que atuam na maquinaria epigenética, modulando o perfil epigenético (o epigenoma) da célula como, por exemplo, DNMTi, HDACi, inibidores de acetiltransferases, demetilases e metiltransferases das histonas e ainda fármacos que atuam nas proteínas reconhecedoras de marcas epigenéticas. Uma das maiores causas de insucesso no tratamento do cancro é o desenvolvimento de resistência à quimioterapia e as alterações epigenéticas podem estar na base de alguns casos. Fármacos epigenéticos estão a ser associados às quimioterapias mais clássicas para contornar este problema e aumentar a eficiência do tratamento. Por outro lado, o diagnóstico precoce é mais uma ferramenta que pode aumentar a taxa de sucesso do tratamento do cancro por isso é importante o estudo de biomarcadores que sejam específicos, precoces e o menos invasivos possível e aqui, mais uma vez, a epigenética releva a sua importância nas futuras direcções da ciência. Neste trabalho discutem-se novas estratégias biomédicas que utilizam a modificação do epigenoma com vista à terapia do cancro.

Palavras-chave: Epigenética; metilação de DNA; Acetilação de histonas; DNMT's; HDAC's; miRNA; Resistência à quimioterapia; MDR; biomarcadores.

ABSTRACT

Epigenetics can be defined as the mechanisms that modulate gene expression but don't alter the primary DNA sequence. The three major groups of epigenetic changes that can be enumerated are the chemical modifications of DNA bases, namely DNA methylation, by addition of a methyl group to the fifth carbon position of a cytosine, reaction catalyzed by DNMT's; posttranslational changes of histones and non-coding RNAs, the most relevant being miRNAs. The epigenome of each isn't constant throughout life, it can be altered, by several factors, including diet, environment, xenobiotics, metabolism and by disease states. Based on that knowledge, new drugs that act in the epigenetic machinery have been developed to modulate the epigenome, such as DNMTi, HDACi, acetyltransferases, demethylases and methyltransferases inhibitors as well and drugs that act on epigenetic reader proteins. One of the biggest causes of failure in the cancer treatments is the resistance to chemotherapy and epigenetic alterations may be one of the underlying causes. Epigenetic drugs are being associated with more classical chemotherapy drugs to circumvent this problem and increase the efficiency of the treatment. The early diagnosis is an important tool to increase the rate of success in the cancer treatment and because of this is important the study of biomarkers that are specific and less invasive as possible, and here again, the epigenetics reveals its importance in the future directions of science. In this work we summarize these new avenues of biomedical research with emphasis in the epigenetics approaches to cancer therapy.

Keywords: Epigenetic; DNA methylation; histone acetylation; DNMT's; HDAC's; miRNA; resistance to chemotherapy; MDR; biomarkers.

I. INTRODUÇÃO

A informação genética, codificada nas moléculas de DNA através da sequência de nucleótidos, presente no nosso organismo é semelhante em todas as células e, no entanto, estas são capazes de exercer funções muito variadas. Isto é, as células nos organismos multicelulares são geneticamente homogêneas, mas estrutural e funcionalmente heterogêneas. Em parte, tal deve-se aos diferentes padrões de expressão genética que se observam em cada uma delas e que são influenciados pelas alterações epigenéticas. A epigenética pode ser definida como o processo de modulação da expressão genética, mas que não provoca alterações na sequência primária de DNA. (Andersen e Tost, 2018; Baer-Dubowska, *et al.*, 2011; Martin e Fry, 2018).

Os mecanismos epigenéticos podem ser divididos em três grandes grupos, nomeadamente as modificações pós-translacionais de histonas, modificação do DNA, sendo a mais importante a metilação do DNA e, por fim, RNAs não codificantes (ncRNAs) onde podemos incluir siRNA e miRNA. (Andersen e Tost, 2018; Baer-Dubowska, *et al.*, 2011; Martin e Fry, 2018).

I.1. Modificações pós-translacionais de histonas

O DNA no núcleo das células apresenta-se numa forma compactada (Figura 1), sendo o nucleossoma o 1º nível de compactação do DNA e que consiste numa porção de 146 pb de DNA enrolado num octâmero de histonas. Este octâmero é constituído por duas histonas H2A, duas histonas H2B, duas H3 e duas H4. (Cutter e Hayes, 2016; Dhanak e Jackson, 2014; Peng e Zhong, 2015).

A cristalografia de raios-X de alta resolução revelou a presença de uma “cauda” N-terminal com aproximadamente 30 aminoácidos que se projeta das histonas. Essa “cauda”, tal como ocorre em muitas outras proteínas na célula, é alvo de vários tipos de modificações covalentes pós-translacionais, nomeadamente, acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ribosilação de ADP, desaminação, isomerização da prolina e propionilação que levam à alteração da sua função, afectando a expressão dos genes associados à respectiva histona. (Baer-Dubowska *et al.*, 2011; Dhanak e Jackson, 2014).

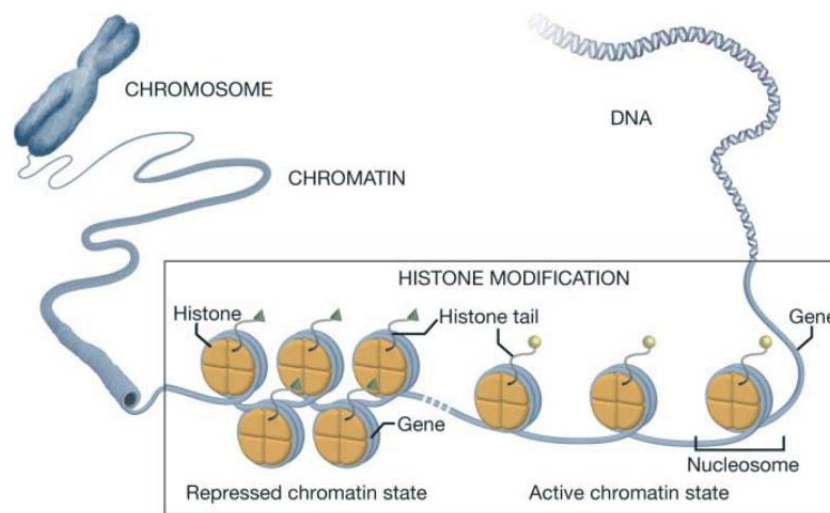


Figura 1: Organização estrutural do DNA compactado. A amarelo o octâmero de histonas com o DNA enrolado e também as caudas das histonas (histone tail) que podem sofrer modificações pós-translacionais. Retirada de (Pieterman *et al.*, 2014).

Estas modificações afetam a expressão genética por dois factores. Em primeiro lugar, podem afetar directamente a estrutura da cromatina: por exemplo a acetilação das histonas como a acetilação da lisina na posição 14 da histona 3 (H3K14ac) leva a uma estrutura menos compacta da cromatina, uma vez que retira a carga positiva da lisina e por isso diminui as interações DNA-Histonas, fenómeno que está geralmente associado a ativação da transcrição. (Bannister e Kouzarides, 2011; Peng e Zhong, 2015). Por outro lado e pela razão inversa, a desacetilação leva geralmente a repressão genética. (Bennett e Licht, 2018; Peng e Zhong, 2015). Em segundo lugar, modulam a ligação de proteínas específicas a um segmento de cromatina que afetam o estado de compactação da cromatina. (Bannister e Kouzarides, 2011).

A acetilação das histonas é catalisada pela família de enzimas acetiltransferases das histonas (HATs), que usam como cofactor a acetil coenzima A (acetil co-A). (Bannister e Kouzarides, 2011). São conhecidas diversas HATs divididas em dois grupos – tipo A e tipo B. As primeiras existem no núcleo e acetilam histonas da cromatina enquanto as segundas acetilam histonas H3 e H4 não nucleossómicas. (Bennett e Licht, 2018).

A família de enzimas responsáveis pela reação inversa – desacetilação – são as deacetilases das histonas (HDAC's). Estas estão divididas em quatro classes: classe I, II, III e IV. As HDAC's da classe III são NAD-dependentes, enquanto as das restantes classes são Zinco dependentes. (Bannister e Kouzarides, 2011; Bennett e Licht, 2018).

A metilação da lisina na posição 9 da histona 3 (H3K9me) está associada a uma cromatina mais compacta (heterocromatina). (Baer-Dubowska *et al.*, 2011). Di e tri-metilação da lisina na posição 4 da histona 3 (H3K4me2/3) estão geralmente associadas a regiões ativamente transcritas e por outro lado tri-metilação da lisina na posição 27 da histona 3 (H3K27me3) está associada a regiões silenciadas. (Baer-Dubowska *et al.*, 2011; Lauschke *et al.*, 2018; Peng e Zhong, 2015). As metiltransferases das histonas que catalisam as reações de metilação subdividem-se em dois grupos, as lisinas metiltransferases e as argininas metiltransferases, estes dois aminoácidos são os locais mais frequentes onde se dão modificações nas histonas, podendo também ocorrer a reação inversa, a desmetilação, catalisado pelas, arginina e lisina demetilases. (Bannister e Kouzarides, 2011; Dhanak e Jackson, 2014).

Em resumo, as histonas permitem, não apenas o empacotamento e a protecção do DNA no núcleo em estruturas altamente organizadas, mas regulam também a acessibilidade e a actividade da maquinaria da transcrição às diversas partes do genoma através da alteração da compactação da cromatina. Esta função reguladora da expressão genética, a regulação epigenética, é dirigida por múltiplas modificações químicas – as modificações epigenéticas em que a acetilação e a metilação são as mais bem conhecidas – que ocorrem nas histonas. Tal regulação epigenética é um processo dinâmico dando origem a um código de histonas, isto é, um perfil de modificações químicas quer nas caudas quer no core da proteína que tem sido relacionado com a saúde e a doença. A transição entre o estado transcricional silencioso e competente depende do balanço entre os designados *writers* (enzimas que adicionam grupos químicos) e *erasers* (enzimas que removem grupos químicos).

Deve finalmente salientar-se que as modificações químicas das histonas regulam os processos da replicação, transcrição e reparação do DNA.

1.2. Metilação do DNA

A modificação de DNA mais extensivamente estudada no genoma dos vertebrados e com maior relevância clínica é a metilação do DNA, nomeadamente a metilação da citosina que, por regra, leva à inibição da expressão do respectivo gene. (Baer-Dubowska *et al.*, 2011; Lauschke *et al.*, 2018). A metilação da citosina é a adição de um grupo metilo ao 5º carbono de uma base de citosina, dando origem à 5-metilcitosina (5mC) (Figura2). Como as citosinas estão emparelhadas com o nucleótido de guanina é comum referir-se a esta metilação como metilação Citosina-fosfato-Guanina (CpG). A grande maioria dos dinucleótidos de CpG localizados ao longo do genoma apresentam-se metilados, no entanto, existem zonas com

uma elevada proporção de dinucleótidos de CpG chamadas ilhas de CpG que se apresentam, geralmente, não metiladas. (Andersen e Tost, 2018; Baer-Dubowska *et al.*, 2011; Martin e Fry, 2018).

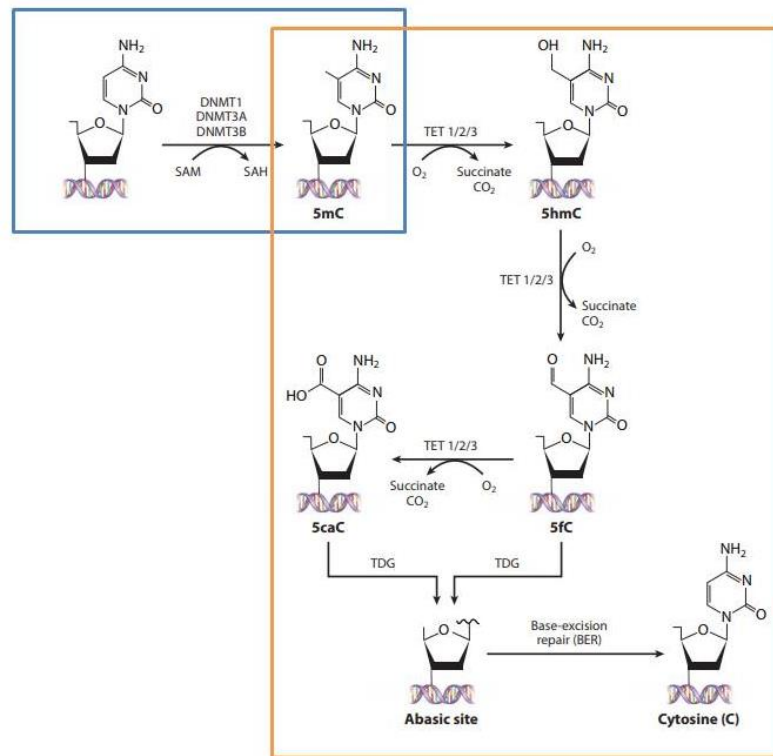


Figura 2: Reação de metilação (azul) e desmetilação (laranja) do DNA e respectivas enzimas envolvidas. Retirada de (Martin e Fry, 2018).

Esta reação é catalisada por uma família de enzimas – DNA metiltransferases (DNMT's) e usa como co-fator a S-adenosilmetionina (SAM), que é o dador do grupo metilo. São conhecidas já quatro DNMT's, nomeadamente a DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. No entanto a DNMT3L tem a falta de um domínio catalítico e só atua em complexo com a DNMT3A. A DNMT1 é uma metiltransferase de manutenção, responsável por manter os padrões de metilação durante o processo de replicação do DNA na divisão mitótica. Por outro lado a DNMT3A e DNMT3B juntamente com a DNMT3L são responsáveis pelas novas metilações em locais que não estavam previamente metilados. (Andersen e Tost, 2018; Martin e Fry, 2018; Sanmiguel e Bartolomei, 2018).

Os grupos metilos podem também ser removidos quer através de processos passivos em que o grupo metilo não é mantido no processo de replicação, quer através de processos ativos, isto é, reações de desmetilação catalisadas pela família de enzimas *ten-eleven translocation* (TET), das quais são conhecidos três subtipos, TET1, TET2 e TET3. Este processo contempla várias etapas, a 5mC é convertida a 5-hidroximetilcitosina (5hmC),

posteriormente esta é convertida a 5-formilcitosina (5fC) e esta por fim a 5-carboxilcitosina (5caC). No fim deste processo a timina-DNA-glicosilase (TDG) retira a 5fC e 5caC e mecanismos de reparação de DNA celulares (reparação por excisão de bases-BER) colocam uma nova citosina não metilada no local. (Figura 2) (Andersen e Tost, 2018; Martin e Fry, 2018).

Os padrões de metilação não são constantes ao longo da nossa vida nem em todos os tecidos e são afetados por estímulos ambientais, exposição a poluentes, xenobióticos, estados nutricionais e estados de doença que poderão causar aumentos gerais no estado de metilação – hipermetilação – bem como, diminuição nos estados gerais de metilação – hipometilação. (Andersen e Tost, 2018; Martin e Fry, 2018).

1.3. ncRNAs

RNAs não codificantes são moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas. São classificadas em RNAs não codificantes curtos ou longos consoante o tamanho seja abaixo ou acima de 200 nucleótidos, respectivamente. Um exemplo destas moléculas são os micro RNAs (miRNAs) com cerca de 22 nucleotídeos. Muitos miRNAs são específicos de tipo de tecido ou estado de diferenciação das células e uma vez que estas moléculas se ligam por complementaridade a moléculas de RNA mensageiro, tal ligação pode ativar o miRNA-*induced silencing complex* (miRISC) com consequente repressão da expressão genética. (Baer-Dubowska *et al.*, 2011; Peng e Zhong, 2015; Peschansky e Wahlestedt, 2014; Zhong e Leeder, 2013).

Em suma, quer o DNA quer as histonas são alvo de modificações pós-tradução reversíveis (acetilação, metilação, fosforilação, etc.) que, em última análise, alteram a arquitetura da cromatina de um modo que pode ser mais ou menos favorável à inibição ou promoção da transcrição dos genes.

Em comparação com o código genético o código epigenético é altamente dinâmico, variando entre tipos de células e responde a estímulos ambientais. Não é pois estranho pensar que modificações epigenéticas tenham um papel central em muitas doenças, incluindo o cancro.

2. ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO CANCRO

O cancro tem sido considerado uma doença exclusivamente associada a fatores genéticos, mas actualmente sabe-se que alterações epigenéticas estão também envolvidas na etiologia da doença e podem ter influência em várias etapas como, promoção, iniciação, progressão, metástases e até resistência à quimioterapia. Em muitos cancros podemos observar hipermetilação de genes supressores de tumor, bem como marcas repressivas nas histonas de um promotor destes genes, o que leva ao silenciamento da expressão genética e perda de função. Por outro lado, perda de metilação e marcas ativadoras podem aumentar a expressão genética de genes oncogénicos. (Bennett e Licht, 2018; Kanwal e Gupta, 2012; Lauschke, *et al.*, 2018). Para além disso, verificam-se também mutações nos modificadores epigenéticos, como DNMT's, HDAC's e TET's. Pensa-se que, em muitos casos, estes padrões de metilação são específicos de tipo de tumor. (Bennett e Licht, 2018; Lauschke *et al.*, 2018).

3. FÁRMACOS BASEADOS EM MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Considerando que o perfil de modificações epigenéticas é definido pelo balanço das reações bioquímicas que catalisam a modificação do DNA e das histonas, a inibição farmacológica destas enzimas pode alterar o balanço epigenético com consequências na expressão genética. Este é o princípio subjacente à ação de fármacos epigenéticos, cujos mecanismos se discutem na próxima secção em mais detalhe.

3.1. Inibidores epigenéticos de primeira geração

Uma vez que há padrões de metilação aberrantes no cancro, começou a surgir a ideia de atuar na maquinaria epigenética para tratamento destas doenças. Assim as DNMT's foram os primeiros alvos terapêuticos da terapia epigenética. Surgiram então os inibidores das DNMT's (DNMTi), análogos da citidina, 5-azacitidina (Azacitidina, medicamento comercializado-Vidaza[®]) e 5-aza-2'-desoxicitidina (Decitabina, medicamento comercializado-Dacogen[®]). Comparativamente com a citidina, estes azanucleótidos têm um átomo de azoto na posição do Carbono-5 do anel pirimidínico da citidina (Figura 3). O seu mecanismo de ação consiste na incorporação destes azanucleótidos nas cadeias de DNA que posteriormente se vão ligar covalentemente à DNMTi irreversivelmente, levando à sua inibição e por isso diminuição de estados de metilação. Ambos os fármacos foram aprovados pela FDA e EMA para o tratamento da leucemia mielóide aguda (LMA), a azacitidina está também autorizada para tratamento de Síndromes mielodisplásicas e leucemia

mielomonocítica crónica. A capacidade de reativarem genes supressores de tumor torna estes fármacos muito atrativos no entanto devido à sua baixa especificidade têm efeitos tóxicos marcados, como principais efeitos indesejáveis podemos indicar a neutropenia febril, anemias, trombocitopenia e pneumonia. Já foi desenvolvido também um pró-fármaco da decitabina – Guadecitabina – com melhores características farmacocinéticas que a anterior, está em estudos para o tratamento da LMA, síndrome mielodisplásico, cancro ovárico e carcinoma hepatocelular. (Bennett e Licht, 2018; EMEA, 2010; Lauschke *et al.*, 2018; Baxter Oncology GmbH [s.d.]).

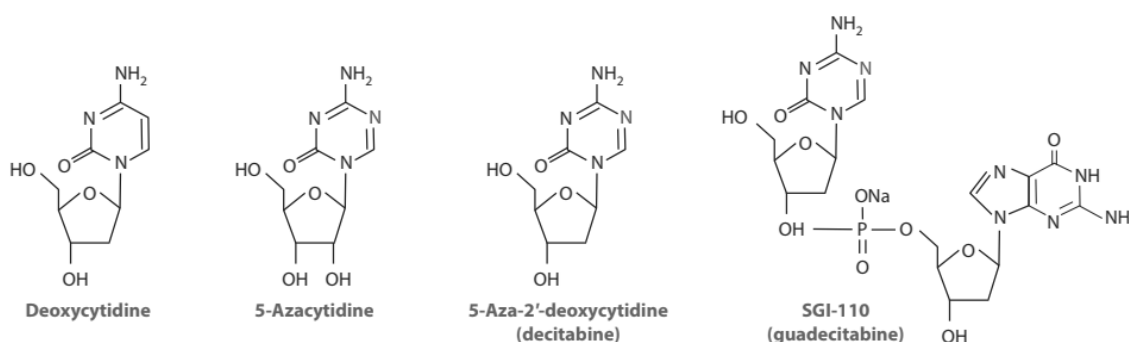


Figura 3: Estrutura química do desoxirribonucleótido desoxicitidina e alguns DNMTi. Desoxicitidina, azacitidina, decitabina e guadecitabina (da esquerda para a direita). Retirada de (Bennett e Licht, 2018).

Zebularina é também um DNMTi análogo da citidina, tendo demonstrado uma atividade antiproliferativa em células de mesotelioma maligno. (Takemura *et al.*, 2018).

Existem já DNMTi não nucleosídeos em estudos, que, uma vez que não são incorporados nas cadeias de DNA os efeitos tóxicos serão menores. É um exemplo o MG98, um inibidor da DNMT1 e também a hidralazina, que actualmente é utilizado como antihipertensor, mas estão a decorrer estudos para testar o seu potencial no tratamento de doenças oncogénicas. (Lauschke *et al.*, 2018; Plummer *et al.*, 2009). Procainimida e procaína são outros DNMTi não análogos da citidina que se encontram em estudos. (Baer-Dubowska *et al.*, 2011).

Outro alvo terapêutico possível é a família de enzimas HDAC's. Os primeiros inibidores das HDAC's (HDACi) surgiram de fontes naturais, mas posteriormente desenvolveram-se vários grupos de moléculas sintéticas com esse fim. Com base na estrutura molecular podemos dividir os HDACi nos seguintes principais grupos, hidroxamatos; benzamidas; ácidos gordos de cadeia curta; peptídeos cíclicos e cetonas eletrofílicas. A maioria destas moléculas é constituída por duas partes, uma que liga à enzima e é responsável pela especificidade e a outra que é capaz de a inactivar e uma vez que muitas

HDAC's são dependentes de zinco a inactivação dá-se pelo sequestro de iões de zinco no local ativo da enzima.

O grupo mais numeroso é dos hidroxamatos onde encontramos já várias moléculas aprovadas como, vorinostate, belinostate, e panabinostate e também muitas moléculas já em ensaios clínicos. Vorinostate contém um grupo funcional de ácido hidroxâmico responsável por fazer o sequestro do ião de zinco, esta molécula está aprovada para o tratamento do linfoma cutâneo das células T. Belinostate obteve aprovação para o tratamento do linfoma periférico das células T e panabinostate (este tem aprovação em Portugal - Farydak®) (Infarmed, I.P., [s.d.]) contém indicação terapêutica para o tratamento de mieloma múltiplo recidivado ou refractário. (Baer-Dubowska *et al.*, 2011; bennett e Licht, 2018; EMEA, 2010; Lauschke *et al.*, 2018).

Romidepsin é um peptídeo cíclico, é inibidor selectivo das HDAC1 e HDAC2 e está aprovado para o tratamento de linfoma cutâneo das células T e linfoma periférico das células T. (Bennett e Licht, 2018).

Na figura 4 está esquematizado o modo de atuação de enzimas *writers* e *erasers* e o local de acção dos inibidores de primeira geração nomeados anteriormente (HDACi e DNMTi).

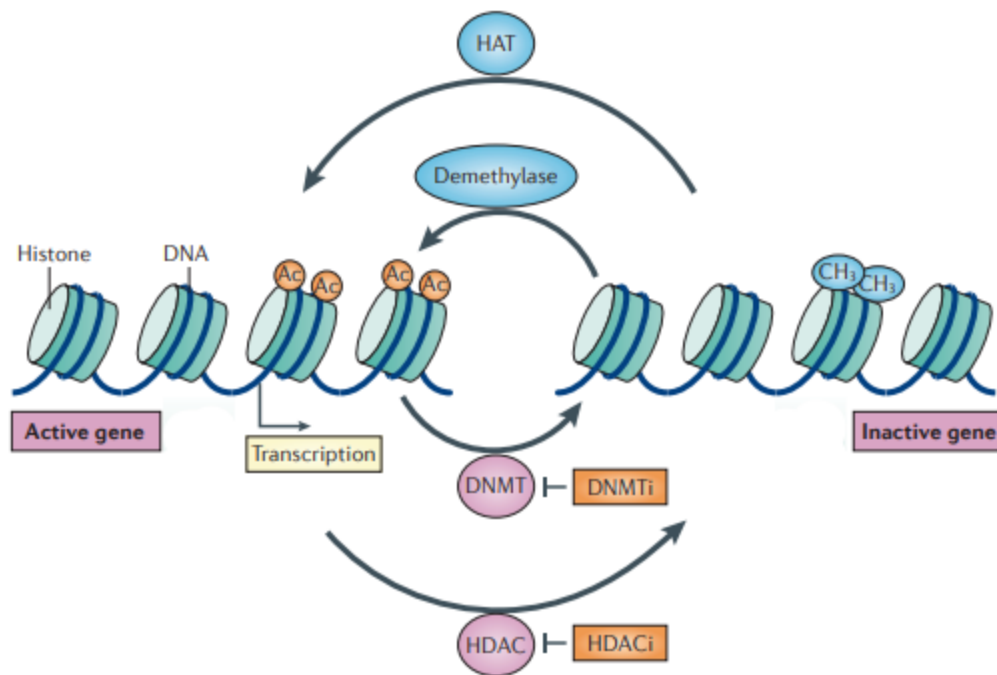


Figura 4: Enzimas *writers* e *erasers* de marcas epigenéticas e local de atuação dos fármacos epigenéticos de primeira geração (rectângulos laranja). Adaptada de (Szyf M., 2015).

3.2. Inibidores epigenéticos de segunda geração

A maioria das pesquisas mais recentes estão voltadas para estes dois alvos terapêuticos referidos anteriormente, inibição das DNMT's e HDAC's, no entanto, paralelamente, decorrem investigações para outros possíveis alvos terapêuticos, destacando-se as acetiltransferases das histonas, metiltransferases das histonas e ainda as demetilases. (Baer-Dubowska *et al.*, 2011; Dhanak e Jackson, 2014).

A metiltransferase EZH2 catalisa a metilação H3K27 e apresenta-se sobreexpressa em vários tipos de câncros. Tazemetostat é um exemplo de molécula em estudo para a inibição desta enzima. Para além desta, também a G9a que catalisa a metilação H3K9me2 e a DOT1L que catalisa a metilação H3K79 têm moléculas em investigação com vista à sua inibição. (Dhanak e Jackson, 2014; Lauschke *et al.*, 2018).

LSD1 catalisa a desmetilação da H3K4 e H4K9 e a família de enzimas JmjC, a maior família de demetilases, têm também já candidatos para a sua inibição. (Dhanak e Jackson, 2014).

3.3. Proteínas reconhecedoras de marcas epigenéticas como alvo terapêutico

Existem proteínas com capacidade para reconhecer marcas epigenéticas, nomeadamente metilações e acetilações de resíduos de lisina e arginina nas caudas N-terminais das histonas. Estas proteínas são capazes de induzir alterações no arranjo estrutural da cromatina, bem como recrutar outras proteínas pela formação de complexos proteicos e influenciar processos nucleares como transcrição, replicação ou reparação do DNA. (Bennett e Licht, 2018; Milosevich e Hof, 2016).

Bromodomain family (BRDs) é uma família de proteínas capazes de reconhecer marcas de acetilação, onde se incluem as *bromodomain and extra terminal* (BET) capazes de reconhecer lisinas acetiladas. Relativamente ao reconhecimento de resíduos metilados as proteínas com mais relevância são as *plant homeodomain fingers* (PHD) e um conjunto de cinco domínios denominados como *Royal family domain*, são eles *Chromodomain*; *Tudor domain*; *plant Aget domain*; domínio Prolina-Triptofano-Triptofano-Prolina (PWWP) e *Malignant Brain Tumor domain* (MBT). (Bennett e Licht, 2018; Dhanak e Jackson, 2014; Milosevich e Hof, 2016).

Está demonstrado que vários tipos de BETs apresentam relevância no cancro, como a sobreexpressão da BRD2 no linfoma das células B, por exemplo. Existem já moléculas

desenvolvidas inibidoras das proteínas BET, JQ1 e IBET762 são duas delas. (Bennett e Licht, 2018; Dhanak e Jackson, 2014).

L3MBTL1 e L3MBTL3 são duas proteínas MBT que demonstraram relevância em eventos oncológicos. Duas das moléculas que estão a ser estudadas para inibir estas proteínas são UNC-1215 e UNC-1679, sendo que a segunda está a demonstrar maior afinidade e selectividade para a L3MBTL3 comparativamente com a L3MBTL1. (Bennett e Licht, 2018; Dhanak e Jackson, 2014; Milosevich e Hof, 2016).

4. RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

Há vários mecanismos possíveis pelos quais células tumorais podem apresentar resistência à quimioterapia. A resistência pode ser primária se se dá antes da exposição ao fármaco ou adquirida e, neste caso dá-se apenas após exposição ao fármaco. (Wu et al., 2014). A resistência adquirida pode incluir *Multi Drug Resistance* (MDR) e, nesta situação, a exposição a uma substância confere resistência a mais substâncias nunca administradas que podem ser estruturalmente relacionadas ou não. (Figura 5) (Markman et al., 2018; Wu et al., 2014).

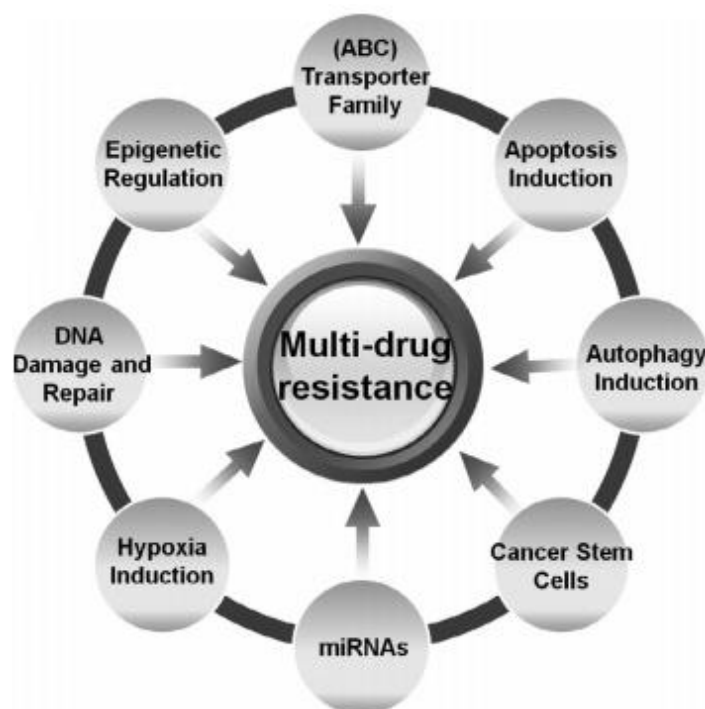


Figura 5: Alguns mecanismos possíveis de *Multi drug resistance* de tumores. Retirada de (Wu et al., 2014).

Os mecanismos de resistência à quimioterapia podem ter natureza farmacológica, bioquímica ou depender da própria fisiologia do tumor. O mecanismo mais simples pode ser explicado pela alteração estrutural, devido a mutações, do alvo terapêutico o que impossibilita o fármaco de efectuar a sua acção farmacológica. Outros mecanismos que explicam a resistência a um fármaco incluem a diminuição da entrada do fármaco na célula ou o aumento do seu efluxo, sendo este um mecanismo com muita relevância e vastamente estudado. De facto, muitos cancros têm sobreexpressão de genes que codificam transportadores de efluxo, em que se destacam os membros da família *ATP-binding cassette* (ABC) onde se inclui a glicoproteína-P codificada pelo gene ABCB1, por exemplo. (Gottesman *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014). Apesar da inibição destes transportadores de efluxo parecer uma estratégia terapêutica viável para contornar esta problemática da resistência, nenhum estudo realizado neste sentido conseguiu ainda mostrar resultados satisfatórios. (Gottesman *et al.*, 2016; Lauschke *et al.*, 2018). Muitas outras razões podem estar na base de resistência à quimioterapia, nomeadamente alterações na metabolização do fármaco com diminuição na sua absorção ou aumento do seu metabolismo e excreção, ou causas relacionadas com particularidades do próprio tumor, deficiente irrigação sanguínea das células do tumor, efeitos de hipóxia ou diferente hidrodinâmica, interações com outras células da matriz tumoral e alteração de respostas homeostáticas. (Gottesman *et al.*, 2016; Markman *et al.*, 2018).

Como referido anteriormente é vulgar no cancro encontrar padrões de metilação aberrantes e modificações nas histonas que regulam o fenótipo do cancro e estão na base de muitos mecanismos da resistência à quimioterapia e MDR. (Lauschke *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2014).

O estado de metilação de genes codificadores de transportadores de fármacos é um aspeto determinante da resposta terapêutica. Por exemplo, a sobreexpressão do gene ABCB1 está associado a MDR e a fraco prognóstico de pacientes com cancro. (El-Khoury *et al.*, 2007; Lauschke *et al.*, 2018). Alteração nos padrões de metilação normais durante o cancro podem também levar a silenciamento de genes supressores de tumor, nomeadamente pela hipermetilação das zonas promotoras destes genes, como é o caso do gene TP53, que é considerado um dos reguladores major da apoptose como resposta a quimioterapia, o que leva portanto a resistência ao tratamento. (Hajji *et al.*, 2018).

Para além da metilação do DNA afetar a resistência à quimioterapia, modificações das histonas podem também influenciar a ativação ou repressão de genes por efeito direto na

transcrição ou alterar a configuração da cromatina. Por exemplo, a hipacetilação da H4K12 pode dar informação acerca do estadiamento do cancro. Padrões de acetilação da H3K18 podem informar sobre o risco de recorrência daquele tumor. (Hajji *et al.*, 2018).

Uma vez que, alterações epigenéticas podem estar na base do desenvolvimento de um tumor ou de resistência ao tratamento, fármacos epigenéticos têm vindo a ser testados e utilizados em combinação com as terapias mais clássicas para aumentar a eficácia do tratamento e as probabilidades de sucesso. (Hajji *et al.*, 2018; Lauschke *et al.*, 2018). Um estudo efetuado em cancro coloretal recorrente e não recorrente demonstrou que há uma hipermetilação global no tipo recorrente e que a administração concomitante da Decitabina com 5-FU foi capaz de sensibilizar novamente as células a este último fármaco por causar hipometilação. (Baharudin *et al.*, 2017). Este inibidor epigenético está também a ser utilizado em outros tipos de cancro, nomeadamente, cancro ovárico para reverter a resistência a carboplatina e também no cancro do colo do útero no caso de perda de sensibilidade das células ao tratamento com cisplatina, taxol e oxaliplatina. (HAJJI *et al.*, 2018).

Estudos com a tricostatina A, um HDACi, também já demonstraram ser capaz de reverter marcas epigenéticas para ressensibilizar as células tumorais aos tratamentos de quimioterapia, por exemplo no carcinoma pulmonar humano em células resistentes ao etopósido. (Lauschke *et al.*, 2018).

5. BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO

Os métodos mais clássicos para diagnóstico do cancro envolvem métodos muito invasivos como biópsias em diversos tipos de cancro, colonoscopia para deteção do cancro coloretal, endoscopia no cancro gástrico, etc. Embora estes testes possam ter bastante eficácia têm algumas limitações, custos e baixa adesão da população, por exemplo. Além disso há cancros em que não é possível fazer-se biópsias devido à sua localização anatómica, portanto fazer a pesquisa em amostras de fluídos corporais é uma boa alternativa e menos invasiva. (Thomas e Marcato, 2018; Vedeld *et al.*, 2018).

Um biomarcador com aplicabilidade clínica para o diagnóstico do cancro deve ter alta especificidade e sensibilidade para distinguir células normais de células tumorais e poder ser detetado em amostras o mais não invasivas possível. (Andersen e Tost, 2018). Marcas epigenéticas podem ser utilizadas como biomarcadores, porque como já vimos anteriormente há alterações epigenéticas específicas de células tumorais. Podem ser usadas

para diagnóstico, mas também para estadiamento e monitorização da resposta à quimioterapia. (Kanwal e Gupta, 2012; Toiyama *et al.*, 2014).

Sequências de DNA metilado, padrões de modificações de histonas e RNAs não codificantes (miRNAs e lncRNAs) são potenciais biomarcadores epigenéticos com aplicabilidade clínica para deteção de cancros. (Kanwal e Gupta, 2012; Thomas e Marcato, 2018). Os tumores libertam porções de DNA com as mesmas características genéticas e epigenéticas que as próprias células tumorais portanto o seu estudo pode ser feito em amostras minimamente invasivas que tenham estado em contacto com o respectivo tumor como, sangue, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano, expectoração, fezes, etc. (Figura 6). (Andersen e Tost, 2018; Lauschke, Barragan *et al.*, 2018; Thomas e Marcato, 2018).

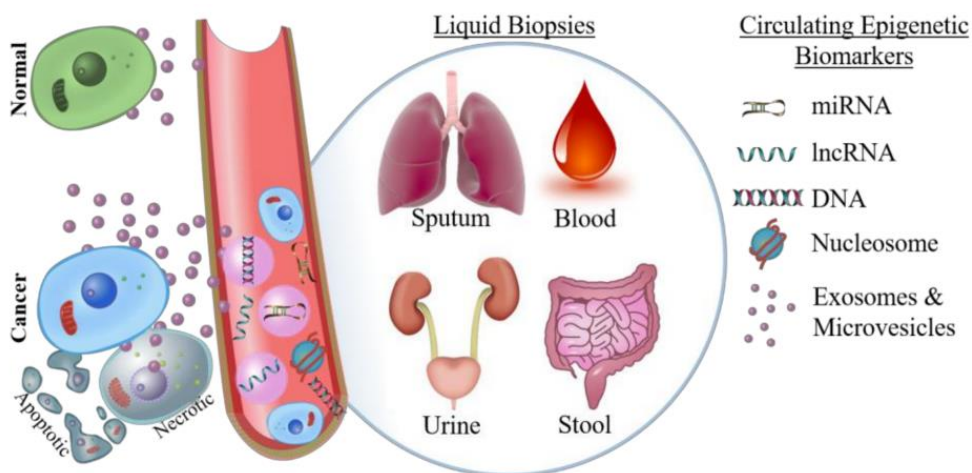


Figura 6: Biomarcadores epigenéticos que podem ser encontrados nas diferentes amostras de fluidos corporais. Retirada de (Thomas E Marcato, 2018).

5.1. Marcas epigenéticas como biomarcadores no cancro

Pacientes com cancro gástrico apresentam hipermetilação de vários genes, DAPK, CDH1, GSTPI, p15 e p16, que pode ser detetada no soro. Pode ser detetada também metilação de outros genes no conteúdo gástrico, MINT25, RORA, GDNF, ADAM23, PRDM5 e MLF1. Sendo que o que demonstrou maior especificidade e sensibilidade foi o MINT25. (Qu, Dang e Hou, 2013; Vedeld *et al.*, 2018).

Há um conjunto de genes hipermetilados com elevada sensibilidade para identificação de pacientes com cancro da mama: APC, BRC1, BIN1, CST6, GSTPI, p16 e TIMP3. (Thomas e Marcato, 2018).

A expressão de diferentes miRNAs pode aparecer aumentada ou diminuída em diferentes tipos de câncros. O miR-378 aparece aumentado em pacientes com câncro gástrico; miR-141 no câncro da próstata. (Thomas e Marcato, 2018).

Uma revisão sistemática acerca de miRNA usados como biomarcadores na progressão do câncro do colo do útero revelou que a expressão de muitos miRNA pode aparecer aumentada ou diminuída ao longo das diversas fases de progressão da doença. Alguns dos miRNA com mais relevância que aparecerem aumentados foram, miR-10a, miR-20b, miR-9, miR-16 e miR-106a e os que demonstraram estar diminuídos foram, miR-99a, miR-203 e miR-195. (Pardini *et al.*, 2018).

Nas células tumorais podemos encontrar alterações de histonas que levam à repressão de genes supressores de tumor ou activação de oncogenes. Vários câncros demonstraram uma perda global de H4K16Ac e H4K20me3. (Thomas e Marcato, 2018).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Hoje sabe-se que não estamos limitados à informação genética codificada no nosso DNA no momento em que nascemos até ao resto da nossa vida. A expressão genética é influenciada por vários fatores e os mecanismos epigenéticos contribuem para a regulação genética. Ao contrário da sequência de DNA o epigenoma não é constante ao longo da vida e pode ser alterado por diversos fatores, exposições a poluentes ambientais, a nossa alimentação, estados de saúde ou doença, etc.

As alterações epigenéticas têm consequências tão importantes que é de extrema necessidade o seu estudo e compreensão. Estados de doença afetam o epigenoma e a nossa resposta a fármacos pode estar alterada. Conseguir compreender como o cancro afeta a metilação do DNA e restantes marcas epigenéticas é um passo em frente para atingir o sucesso no seu tratamento. Atuar diretamente na maquinaria epigenética, compreender os mecanismos da resistência à quimioterapia ou MDR e usar terapias epigenéticas em associação com terapias convencionais para aumentar a sua eficácia e poder ressensibilizar células que mostraram resistência a determinado fármaco são as futuras direções da ciência.

Outra vertente de extrema importância nesta doença é a sua deteção o mais precocemente possível. Neste aspeto, é importante a descoberta de biomarcadores que possam ser detetados em fases iniciais da doença e com métodos o menos invasivos e o mais específicos possível e aqui mais uma vez a epigenética e respetivas alterações fornecem uma ferramenta útil.

A epigenética é um assunto muito vasto que tem recebido atenção crescente nos últimos anos e constitui uma janela de novas oportunidades terapêuticas e tem as mais diversas aplicações é portanto um assunto da atualidade que merece a nossa atenção e contínuo conhecimento.

Avanços tecnológicos recentes estão a permitir estudar a epigenética do cancro não apenas em genes isolados mas ao nível mais global do genoma, avaliando coleções de genes. Esta estratégia está já a dar frutos em investigação translacional e a abrir novos caminhos na terapia epigenética do cancro.

7. BIBLIOGRAFIA

Andersen, G. B., Tost, J. - **A Summary of the Biological Processes, Disease-Associated Changes, and Clinical Applications of DNA Methylation.** Archetypal Psychotherapy: The Clinical Legacy of James Hillman. 1708 (2018) p. 3–30.

Baer-dubowska, W., Majchrzak-Celińska, A., Cichocki, M. - **Pharmacoeigenetics: A new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs.** Pharmacological Reports. 63:2 (2011).

Baharudin, R., Mutalib, N. A., Othman, S. N., Sagap, I., Rose, I. M., Mokhtar, N. M., Jamal, R. - **Identification of predictive DNA methylation biomarkers for chemotherapy response in colorectal cancer.** Frontiers in Pharmacology. 8 (2017) p. 1–14.

Bannister, A. J., Kouzarides, T. - **Regulation of chromatin by histone modifications.** Cell Research. 21:3 (2011) p. 381–395.

Baxter Oncology GMBH - **Resumo das características do medicamento - Vidaza®** [Consultado a 8 de agosto de 2018] Disponível na internet em: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180412140761/anx_140761_pt.pdf

Bennett, R. L., Licht, J. D. - **Targeting Epigenetics in Cancer.** Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 58:1 (2018) p. 187–207.

Cutter, A., Hayes, J. J. - **A Brief Review of Nucleosome Structure.** FEBS Lett. 589 (2016) p. 2914–2922.

Dhanak, D., Jackson, P. - **Development and classes of epigenetic drugs for cancer.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 455:1–2 (2014) p. 58–69.

El-Khoury, V., Breuzard, G., Fourre, N., Dufer, J. - **The histone deacetylase inhibitor trichostatin a downregulates human MDRI (ABCB1) gene expression by a transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model.** British Journal of Cancer. 97:4 (2007) p. 562–573.

EMA - **Resumo das Características do Medicamento - Dacogen®** 2010 [Acedido a 7 de agosto de 2018], Disponível na internet: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170824138676/anx_138676_pt.pdf

EMA - **Resumo das Características do Medicamento - Panobinostat[®]**. 2010 [Acedido a 7 de agosto de 2018], Disponível na internet: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170623138046/anx_138046_pt.pdf

Gottesman, M. M., Lavi, O., Hall, M. D., Gillet, J. - **Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance**. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 56:1 (2016) p. 85–102.

Hajji, N., García-Domínguez, D. J, Hontecillas-Prieto, L., O'Neill, K., Alava E., Syed, N. - **The bitter side of epigenetics: variability and resistance to chemotherapy**. Epigenomics. (2018).

Infarmed, I.P. - **Infomed** [Acedido a 9 de agosto de 2018] Disponível em <http://app7.infarmed.pt/infomed/lista.php>

Kanwal, R.; Gupta, S. - **Epigenetic modifications in cancer**. Clinical Genetics. 81:4 (2012) p. 303–311.

Lauschke, V. M.; Barragan, I.; Ingelman-Sundberg, M. - **Pharmacoeugenetics and Toxicoeugenetics: Novel Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities**. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 58:1 (2018) p. 161–185.

Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., Ljubimova, J. Y. - **Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance**. Nanomedicine. 65 (2018) p. 1866–1879.

Martin, E. M., Fry, R. C. - **Environmental Influences on the Epigenome: Exposure-Associated DNA Methylation in Human Populations**. Annual Review of Public Health. 39:1 (2018) p. 309–333.

Milosevich, N., Hof, F. - **Chemical Inhibitors of Epigenetic Methyllysine Reader Proteins**. Biochemistry. 55:11 (2016) p. 1570–1583.

Pardini, B., Maria, D., FRancavilla, A., Gaetano, C., Ronco, G., Naccarati A. - **MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: A systematic review**. BMC Cancer. 18:1 (2018) p. 1–17.

Peng, L., Zhong, X.- **Epigenetic regulation of drug metabolism and transport**. Acta Pharmaceutica Sinica B. 5:2 (2015) p. 106–112.

- Peschansky, V. J., Wahlestedt, C. - **Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation.** *Epigenetics.* 9:1 (2014) p. 3–12.
- Pieterman, C. R. C., Conemans, E. B., Dreijerink, K. M. A., Laat, J. M., Timmers, H. T. M., Vriens, M. R., Valk, G. D.- **Thoracic and duodenopancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type I: Natural history and function of menin in tumorigenesis.** *Endocrine-Related Cancer.* 21:3 (2014).
- Plummer, R., Vidal, L., Griffin, M., Lesley, M., Bono, J., Coulthard, S., Sludden, J., Siu, L. L. Chen, E. X., Oza, A. M., Reid, G. K., Mcleod, A. R., Besterman, J. M., Lee, C., Judson, I., Calvert, H., Boddy, A. V.- **Phase I study of MG98, an oligonucleotide antisense inhibitor of human DNA methyltransferase 1, given as a 7-day infusion in patients with advanced solid tumors.** *Clinical Cancer Research.* 15:9 (2009) p. 3177–3183.
- Qu, Y., Dang, S., Hou, P. - **Gene methylation in gastric cancer.** *Clinica Chimica Acta.* 424 (2013) p. 53–65.
- Sanmiguel, J. M., Bartolomei, M. S. - **DNA methylation dynamics of genomic imprinting in mouse development.** *Biology of Reproduction.* (2018).
- Szyf M. - **Prospects for the development of epigenetic drugs for CNS conditions.** *Nature Reviews Drug Discovery.* 14 (2015) p. 461–474.
- Takemura, Y., Satoh, M., Hatanaka, K., Kubota, S.- **Zebularine exerts its antiproliferative activity through s phase delay and cell death in human malignant mesothelioma cells.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 82:7 (2018) p. 1159–1164.
- Thomas, M. L.; Marcato, P. - **Epigenetic modifications as biomarkers of tumor development, therapy response, and recurrence across the cancer care continuum.** *Cancers.* 10:4 (2018).
- Toiyama, Y., Okugawa, Y, Goel, A. - **DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 455:1–2 (2014) p. 43–57.
- Vedeld, H. M., Goel, A., Lind, G. E. - **Epigenetic biomarkers in gastrointestinal cancers: The current state and clinical perspectives.** *Seminars in Cancer Biology.* (2018).

Wu, Q., Yang, Z., Nie, Y., Shi, Y., Fan, D. - **Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches.** Cancer Letters. 347:2 (2014) p. 159–166.

Zhong, X., Leeder, J. S. - **Special Section on Epigenetic Regulation — Commentary Epigenetic Regulation of ADME-Related Genes: Focus on Drug Metabolism and Transport.** Drug Metabolism and Disposition. 41 (2013) p. 1721–1724.