



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Vasco Filipe Alves Lopes

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Conexina 43 no cancro da mama: papel fisiopatológico e potencial terapêutico” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. João Maia, da Dra. Dina Lopes e da Professora Doutora Alexandrina Mendes apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Vasco Filipe Alves Lopes

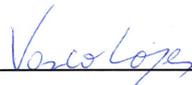
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Conexina 43 no cancro da mama: papel fisiopatológico e potencial terapêutico” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, do Dr. João Maia, da Dra. Dina Lopes e da Professora Doutora Alexandrina Mendes e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2019

Eu, Vasco Filipe Alves Lopes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014191632, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Conexina 43 no cancro da mama: papel fisiopatológico e potencial terapêutico” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 2 de setembro de 2019.



---

(Vasco Filipe Alves Lopes)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, irmã e avós, por todo o apoio incondicional, e a quem devo tudo aquilo que sou hoje e serei amanhã.

À Bárbara, pela compreensão e apoio inesgotável, por me fazer crescer enquanto pessoa e por estar sempre presente.

A todos os meus amigos, pela compreensão, partilha e momentos vividos.

A todos os antigos e atuais membros da Imperial TAFFUC, pelos momentos, amizades, companheirismo e ensinamentos partilhados.

À Professora Doutora Alexandrina Mendes, pela simpatia, ajuda, dedicação e orientação concedida na realização da monografia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e aos seus docentes, pelo profissionalismo e grau de excelência na minha formação.

A Coimbra, por me ter proporcionado os melhores anos da minha vida.

## **Parte I**

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

## **Parte II**

Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.

## **Parte III**

Monografia: “Conexina 43 no cancro da mama: papel fisiopatológico e potencial terapêutico”

# Índice

## Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	9
<b>1. Introdução</b> .....	10
<b>2. Análise SWOT</b> .....	11
<b>2.1. Pontos Fortes</b> .....	11
2.1.1. Localização e população abrangida.....	11
2.1.2. Equipa que compõe a farmácia.....	11
2.1.3. Multiplicidade de tarefas realizadas .....	12
2.1.4. <i>Software</i> SIFARMA 2000® .....	12
<b>2.2. Pontos Fracos</b> .....	12
2.2.1. Número de estagiários na farmácia.....	12
2.2.2. Aconselhamento farmacêutico .....	13
2.2.3. Variedade de regimes de comparticipação complementares.....	14
<b>2.3. Oportunidades</b> .....	15
2.3.1. Receitas por DCI.....	15
2.3.2. Cartão Saúda+ - Sistema de fidelização.....	16
2.3.3. Filosofia <i>kaizen</i> .....	16
<b>2.4. Ameaças</b> .....	16
2.4.1. Estagiário visto aos olhos da população .....	16
2.4.2. Liberalização de MNSRM.....	17
2.4.3. Rutura de <i>stocks</i> .....	18
<b>3. Casos Clínicos</b> .....	19
<b>3.1. Gastroenterite</b> .....	19
<b>3.2. Odinofagia e congestão nasal</b> .....	19
<b>4. Considerações Finais</b> .....	21
<b>5. Bibliografia:</b> .....	22
 <b>Parte II – Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.</b>	
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	24
<b>1. Introdução</b> .....	25
<b>2. Análise SWOT</b> .....	26
<b>2.1. Pontos Fortes</b> .....	26
2.1.1. Funcionamento do INFARMED I.P.....	26
2.1.2. Diversidade/multiplicidade de tarefas.....	26
2.1.3. Competências adquiridas na área de AR .....	27
2.1.4. Material informático / <i>Software</i> .....	27

<b>2.2. Pontos Fracos</b> .....	28
2.2.1. Complexidade dos Processos e Tempo de Espera.....	28
2.2.2. Autonomia/ Dependência de outros profissionais.....	28
2.2.3. Período de estágio reduzido.....	29
<b>2.3. Oportunidades</b> .....	29
2.3.1. Visão interna da autoridade regulamentar.....	29
2.3.2. Reuniões da Comissão de Avaliação do Medicamentos (CAM).....	30
2.3.3. Visita ao laboratório da Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ).....	30
<b>2.4. Ameaças</b> .....	31
2.4.1. Falta de recursos humanos.....	31
2.4.2. Tempo de Aprendizagem.....	31
2.4.3. Processos mal submetidos pelos TAIM.....	31
<b>3. Considerações Finais</b> .....	33
<b>4. Referências Bibliográficas</b> .....	34
<b>Parte III – Conexina 43 no cancro da mama: papel fisiopatológico e potencial terapêutico</b>	
<b>Resumo</b> .....	36
<b>Abstract</b> .....	37
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	38
<b>1. Introdução</b> .....	39
<b>2. Cancro da mama</b> .....	40
<b>2.1. Marcadores de Estádio, de Prognóstico e Preditivos</b> .....	41
<b>2.2. Subtipos moleculares</b> .....	42
2.2.1. Subtipos Luminais.....	42
2.2.2. Subtipo Enriquecido em HER2.....	42
2.2.3. Subtipos Triplo-Negativos.....	43
<b>3. Conexinas</b> .....	44
<b>3.1. Nomenclatura</b> .....	45
<b>3.2. Estrutura</b> .....	45
<b>3.3. Funções Biológicas</b> .....	46
<b>3.4. Localização e tamanho</b> .....	47
<b>3.5. A importância do domínio TC</b> .....	47
3.5.1. Modificações pós-tradução da Cx43.....	48
3.5.2. Os parceiros da Cx43 – Interactoma.....	50
<b>4. Cx43 e CM</b> .....	54
<b>4.1. Cx43 e progressão tumoral do CM</b> .....	55

4.1.1. Sub-expressão da Cx43 .....	55
4.1.2. Sobre-expressão da Cx43 .....	56
<b>4.2. Cx43 e Metastização do CM</b> .....	<b>57</b>
4.2.1. Sobre-expressão da Cx43 .....	58
4.2.2. <i>Knockdown</i> da Cx43 .....	59
<b>5. Estratégias terapêuticas</b> .....	<b>60</b>
<b>5.1. Abordagens terapêuticas que exploram a função Cx43</b> .....	<b>60</b>
5.1.1. Potenciais estratégias terapêuticas e a sub-expressão da Cx43 .....	61
5.1.2. Potenciais estratégias terapêuticas e a sobre-expressão da Cx43 .....	65
<b>5.2. Desafios clínicos na terapêutica de Cx</b> .....	<b>69</b>
<b>5.3. Potenciais estratégias futuras</b> .....	<b>69</b>
<b>6. Considerações Finais</b> .....	<b>70</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>72</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>79</b>

# **Parte I**

## **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

### **Farmácia Machado**



## **Lista de Abreviaturas**

**AINE's** – Anti-inflamatórios não esteroides

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MNSRM** – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

**SAMS** – Serviço de Assistência Médico Social do Sindicato dos Bancários

**SWOT** – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities e Threats*

## I. Introdução

O farmacêutico é um profissional de saúde e agente de saúde pública que faz o elo de ligação entre os médicos prescritores e a população em geral, tendo portanto uma enorme responsabilidade na dispensa de medicamentos e produtos de saúde. Sendo o último a contactar com o doente antes da toma de medicamentos, é de primar que este ceda a informação correta e necessária ao utente para a toma segura, eficaz e racional do medicamento, podendo evitar assim quaisquer interação ou reação adversa que possam ocorrer durante a toma do mesmo. Tem ainda a responsabilidade e o dever de fomentar não só a educação para a saúde, como a prevenção da doença.

O Estágio Curricular é o culminar de nove semestres de aprendizagem, onde finalmente consolidamos e colocamos em prática todo o conhecimento adquirido até então, quer na área de farmacologia, como na de bioquímica, de gestão e até deontológica. Realizado este estágio em farmácia comunitária, é notório o desenvolvimento de capacidades de decisão e resolução de problemas, e ainda de *soft-skills*, dado contactar com um vasto leque de pessoas de diversas faixas etárias e socioeconómicas.

De acordo com o plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), realizei o meu estágio curricular em farmácia comunitária entre janeiro de 2019 e abril de 2019, na Farmácia Machado, sob a tutela do Diretor Técnico, Dr. João Maia. Durante o mesmo realizei tarefas de *back-office*, como aprovisionamento de medicamentos e produtos de saúde, gestão de stocks, verificação de validades, e ainda preparação de lineares, medições de glicémias e pressão arterial, bem como atendimento ao balcão.

O presente relatório, estruturado na forma de SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*), diz respeito ao estágio realizado na Farmácia Machado, onde faço uma apreciação crítica do que influenciou positivo ou negativamente o mesmo, bem como possíveis lacunas que possam ter ficado por preencher.

## **2. Análise SWOT**

### **2.1. Pontos Fortes**

#### **2.1.1. Localização e população abrangida**

A Farmácia Machado encontra-se situada no centro de Celas, próximo de escolas secundárias e faculdades, do Centro de Saúde de Celas, Instituto Português de Oncologia e ainda do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, o que permite que a farmácia tenha utentes bastantes heterogéneos no que diz respeito a classes etárias, e até mesmo socioeconómicas.

Considero este fator uma mais-valia para o meu estágio, no sentido em que o contacto com um vasto leque de utentes se traduz num atendimento bastante diferenciado, o que leva, por sua vez, a um aconselhamento bastante diversificado consoante a situação em questão, permitindo um desafio e melhoria constante, pondo em prática a maioria das valências adquiridas com o plano de estudos de MICF.

#### **2.1.2. Equipa que compõe a farmácia**

A equipa da farmácia é composta pelo Diretor Técnico Dr. João Maia, pelas farmacêuticas Dra. Graziela Grade, Dra. Ana Rita Garrett e Dra. Mariana Lopes, pelo técnico de farmácia Sr. Eduardo Cruz, e, por fim, pela Dra. Maria João, que sendo a proprietária, é responsável pela parte burocrática.

Considero que uma boa equipa de trabalho é um dos pilares essenciais para o sucesso da farmácia, pois só assim conseguimos superar as adversidades do exercício da profissão e caminhar para um futuro promissor, criando o ambiente ideal para receber e instruir da melhor forma um estagiário. Desde cedo que a boa disposição, simpatia, companheirismo e disponibilidade prestada pela equipa me fez sentir integrado na farmácia, e com o passar do tempo, senti um à vontade crescente para esclarecer qualquer dúvida que surgisse, desde o trabalho de *back-office* na receção de encomendas e arrumo dos medicamentos, ao atendimento ao balcão e aconselhamento farmacêutico. Para além disso, desafiavam-me a saber mais sobre cada medicamento e produto de saúde, como a indicação terapêutica, grupo farmacológico ou até mesmo a posologia, principalmente nos Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM).

Sinto que este fator tornou-se uma mais-valia para o meu crescimento enquanto pessoa e profissional de saúde na área de farmácia comunitária.

### **2.1.3. Multiplicidade de tarefas realizadas**

Apesar de nos primeiros dias de estágio este não passar da observação de como as atividades dentro da farmácia eram realizadas, desde cedo contactei com todo o percurso do medicamento dentro da farmácia, desde a visualização de como as encomendas eram realizadas, até à sua entrada no sistema, na realização e regularização de devoluções, gestão dos *stocks*, arrumo dos medicamentos na respetiva gaveta ou linear, e até mesmo ao atendimento ao público, o que me permitiu um ideia geral do exercício da profissão.

Indo de encontro ao ponto anterior, tendo a ajuda e acompanhamento incansável dos restantes colaboradores da farmácia, considero a realização de todas estas tarefas desde o início do estágio uma importante ferramenta para o desenvolvimento de confiança e autonomia no trabalho, que sem dúvida marcaram positivamente o meu estágio. Sem este, certamente não seria tão enriquecedor como foi, e certamente não preencheria todas as lacunas necessárias para formar um bom profissional.

### **2.1.4. Software SIFARMA 2000®**

O *software* atualmente em vigor na Farmácia Machado é o SIFARMA 2000®, o qual é utilizado para desempenhar todas as tarefas que dizem respeito ao exercício da profissão, desde a parte do atendimento (criar ou abrir a ficha do utente na farmácia e leitura da receita médica), até à gestão e receção de encomendas, consulta das características do medicamento, verificação e correção de validades e *stocks*, regularização e gestão das devoluções e créditos, consulta do resumo de faturação, entre outros.

Dada a simplicidade e versatilidade do sistema e o facto de ser bastante intuitivo, este, permite uma melhor e mais rápida aprendizagem do seu funcionamento, além de melhorar e facilitar a organização e gestão da farmácia pelos colaboradores, sentindo assim que esta foi uma ferramenta decisiva no aprimoramento das minhas capacidades enquanto estagiário.

## **2.2. Pontos Fracos**

### **2.2.1. Número de estagiários na farmácia**

Como já anteriormente referido, a Farmácia Machado tem uma equipa composta pelo Diretor Técnico, três farmacêuticas e um técnico de farmácia. Este ano aceitaram três estagiários para cada período, de janeiro a abril, e de abril a julho inclusive.

Posto isto, se compararmos o aproveitamento do estágio quando estamos sozinhos ou quando estamos com mais dois estagiários, a aprender o mesmo e realizar as mesmas funções, desde a entrada de encomendas e arrumo dos medicamentos, ao atendimento, este seja

bastante diferente. Foram várias as situações em que tivemos que dividir a mesma tarefa, e foram muitos os tempos que tivemos parados. Para além disso, no mês de Abril éramos seis estagiários e, apesar de nesta altura já sermos bastante autónomos, as tarefas ficaram ainda mais escassas e senti que isto foi bastante prejudicial para o meu processo de aprendizagem.

Considero, portanto, o número de estagiários como o principal ponto fraco do estágio, dado considerar que o conhecimento adquirido não foi o mesmo que seria se tivesse sozinho ou apenas com mais um estagiário.

### **2.2.2. Aconselhamento farmacêutico**

O aconselhamento farmacêutico é fundamental no exercício da nossa profissão, sendo um desafio constante colocar em prática todo o conhecimento adquirido ao longo do nosso percurso académico durante o estágio, esclarecendo todas e quaisquer dúvida que o utente possa ter, o que se torna bastante gratificante para nós estagiários.

Apesar de o plano curricular de MICEF estar bem estruturado, senti algumas lacunas na área de Dermofarmácia e Cosmética, Preparações de Uso Veterinário e ainda de Suplementos Alimentares.

#### **2.2.2.1. Dermofarmácia e Cosmética**

Dada a grande variedade de marcas de cosmética que existem no mercado, e a elevada oferta de produtos dentro da mesma marca, é de esperar que cada farmácia disponha, apenas, de uma restrita gama de produtos, que nem sempre vão de encontro ao que o consumidor e utente procuram.

Foram várias as vezes em que solicitaram aconselhamento para problemas de pele seca, com rosácea, atópica, e para as várias faixas etárias, desde bebés a adultos. Ao início, tinha sempre que pedir apoio a algum farmacêutico da equipa para ver qual o produto mais aconselhado para aquele caso, e ouvia o aconselhamento feito ao utente. Apenas assim, e ao ler o rótulo de cada produto, é que consegui aconselhar da melhor forma possível e esclarecer as dúvidas da pessoa. Seria de esperar que fossemos melhor preparados para o aconselhamento farmacêutico nesta área, mas a cadeira de Dermofarmácia e Cosmética que nos é lecionada não é direcionada para este exercício. Posto isto, considero que se podia dar mais ênfase ao aconselhamento farmacêutico.

### **2.2.2.2. Preparações de Uso Veterinário**

A localização da Farmácia Machado num meio citadino limita, como é de esperar, a solicitação de produtos de uso veterinário, o que nos leva a contactar menos com este tipo de produtos, fazendo com que o nosso aconselhamento seja escasso. No entanto, tive oportunidade de ceder antiparasitários externos e internos para animais de companhia, além de anticoncepcionais.

Apesar de termos uma unidade curricular direcionada para esta vertente, senti que se foca muito na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos, e não tanto na parte do aconselhamento. Com isto, sinto que se houvesse uma reestruturação da cadeira, com inclusão da parte do aconselhamento, seria uma mais-valia para todos os estudantes.

### **2.2.2.3. Suplementos Alimentares**

Com a quantidade e diversidade de informação que corre nos *media* nos dias de hoje, as pessoas procuram suplementar a sua dieta com o intuito de aumentar a função cognitiva ou sistema imunitário, melhorar a memória, auxiliar a concentração, entre outros, tirando partido dos suplementos alimentares. As Indústrias Farmacêuticas, como era de esperar, para colmatar possíveis falhas no mercado, criaram ou melhoraram diversos produtos, o que faz com que haja uma enorme oferta de produtos nesta área.

O facto de cada pessoa informar-se *à priori* de possíveis suplementos alimentares a tomar, torna-se bastante desafiante pois chegam à farmácia com dúvidas em relação aos constituintes dos suplementos, questionando as suas propriedades e características, como podem ser tomados, se existem possíveis efeitos adversos e se podem ser tomados concomitantemente com certas terapias, e também em relação ao benefício/custo.

### **2.2.3. Variedade de regimes de participação complementares**

O Estado Português comparticipa o custo de medicamentos, através do SNS, a todos os cidadãos portugueses ou estrangeiros que tenham autorização de residência ou trabalho. Existem quatro escalões de comparticipação, sendo que estes variam consoante a indicação terapêutica do medicamento, a sua utilização, as entidades que o prescrevem e também doentes com determinadas patologias que tenham um consumo elevado de determinados medicamentos. [1]

Além deste regime de comparticipação, há ainda regimes de comparticipação acessórias, como por exemplo SAMS, EDP-Sãvida e CTT-Medis. Em receitas eletrónicas, após abertura da receita e escolha dos medicamentos a dispensar, temos que ir ao atalho “Planos”

e acrescentar este tipo de comparticipação, o que se torna bastante fácil devido ao sistema SIFARMA 2000®. A situação mais desafiante é mesmo as de receitas manuais, em que temos que tirar cópia da receita com o cartão de comparticipação adicional no verso, seguido do pedido da assinatura do utente para depois podermos enviar para essas entidades.

Todo este mecanismo é bastante complexo comparado com as receitas eletrónicas, o que aliado à minha inexperiência inicial levou ao atraso no atendimento e até à anulação de algumas vendas, quer por engano meu, que não adicionei o plano de comparticipação complementar, ou do utente por não informar que tinha este regime. No entanto, dando atenção especial a este tipo de situações, consegui colmatar esta fraqueza, otimizando assim o tempo de atendimento e aconselhamento.

## **2.3. Oportunidades**

### **2.3.1. Receitas por DCI**

Através da publicação da Lei n.º 11/2012, de 8 de março e da Portaria n.º 137-A/2012 de 11 de maio, definiu-se o sistema de prescrição por Denominação Comum Internacional (DCI), que levou a alteração das regras de prescrição e dispensa de medicamentos para: substância ativa, forma farmacêutica, dosagem, apresentação e indicação da dosagem, prevendo as situações de exceção justificada como índices ou margens terapêuticas estreitas, intolerância ou reação adversa, e ainda de necessidade de continuidade de tratamento com duração superior ou igual a 28 dias. [2]

A prescrição por DCI incentiva, de facto, o uso de medicamentos genéricos, que têm uma inquestionável segurança, qualidade e eficácia, desempenhando um papel fundamental no uso racional e sustentável do medicamento, podendo ser uma fonte de poupança para todos os cidadãos. Efetivamente, este tipo de receita leva a uma dissociação de marcas de medicamentos das patologias, sendo a evidência farmacológica a determinante na opção clínica, o que propicia a competitividade entre promotores de medicamentos genéricos.

Para além disso, durante o plano de estudos de MICF todos os fármacos são apresentados e estudados pela sua substância ativa, o que facilita o nosso raciocínio aquando do contacto com as receitas por DCI, podendo responder mais eficazmente às questões levantadas pelos utentes, e ainda a previsão de posologia e dosagem para a toma daquele medicamento em específico.

### **2.3.2. Cartão Saúde+ - Sistema de fidelização**

A Farmácia Machado faz parte das Farmácias Portuguesas, que disponibilizam o cartão Saúde+, utilizado a nível nacional, que permite ao utente acumular pontos realizando compras de MNSRM, de produtos da saúde e bem-estar, e ainda de serviços farmacêuticos, trazendo a vantagem de possibilitar a troca desses pontos por vales de desconto que são utilizados para pagar a fatura, por produtos que constam num catálogo, e ainda ter promoções exclusivas.

**[3]**

Mais importante para a farmácia, este cartão trás a vantagem de poder fidelizar o cliente na nossa farmácia, o que cria condições para que este volte. Com isto, e sendo largamente utilizado na farmácia onde estagiei, tive a oportunidade de perceber a ligação empresa-utente, o que comprovou a utilidade deste cartão.

### **2.3.3. Filosofia kaizen**

Ao longo do estágio na Farmácia Machado tive a oportunidade de contactar com o programa *kaizen*, implementado nas farmácias pela Glintt®. Esta filosofia, que foi desenvolvida no Japão, tem como pressupostos a melhoria contínua, diária, envolvendo todos os colaboradores na farmácia para otimizar a produtividade e rentabilidade de cada um, planeando atividades, discutindo ideias e tentar prever possíveis falhas que possam ocorrer na realização das tarefas. Para tal, a cada dia há um colaborador encarregue de dirigir a reunião entre todos, com vista a aperfeiçoar as atividades executadas na farmácia, além de colocar todos a par da realidade vivida na farmácia, no que toca por exemplo à quota de genéricos, aos créditos feitos, entre outros. **[4]**

O contacto com esta filosofia foi deveras uma oportunidade, pois foi-me incutido diariamente princípios que tinham impacto positivo nas atividades que realizava, e onde havia um envolvimento geral dos colaboradores, criando assim um clima organizacional em prol da melhoria contínua da atividade farmacêutica e da gestão sustentável dos recursos da farmácia, quer humanos ou materiais.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. Estagiário visto aos olhos da população**

A Farmácia Machado, existente há largos anos, apresenta inúmeros clientes fidelizados e que desde sempre se dirigem a este estabelecimento para aviar as suas receitas e procurar o melhor e mais completo aconselhamento na área farmacêutica, procurando preferencialmente os elementos da equipa técnica em detrimento dos estagiários, pois para

os mesmos ser estagiário poderá ser sinónimo de inexperiência e falta de conhecimento. Senti muitas vezes o evitamento por parte do utente em ser atendido por mim, e a falta de receptividade aquando do aconselhamento, requerendo na maioria das vezes a opinião dum membro da equipa.

Neste sentido, senti que a dificuldade em criar uma proximidade e empatia com alguns dos utentes da farmácia poderá ter sido um entrave à minha evolução. No entanto, nunca deixei que isso afetasse o meu desempenho e fui demonstrando com trabalho, esforço e dedicação que somos futuros profissionais de saúde, e que possuímos o conhecimento e capacidades para aconselhar e satisfazer as necessidades da pessoa, ganhando posteriormente a confiança daqueles que inicialmente se mostraram pouco recetivos em relação ao meu atendimento.

#### **2.4.2. Liberalização de MNSRM**

Em 2005, os MNSRM sofreram alterações legislativas que permitiram a sua dispensa em locais devidamente autorizados para o efeito, deixando de ser de venda exclusiva em farmácias comunitárias, além da liberalização do preço dos mesmos. [5]

O aparecimento das parafarmácias e dos grandes estabelecimentos comerciais, como a *Wells*, devido ao seu potencial económico conseguem mais descontos dos armazenistas em relação às farmácias pois adquirem muitas embalagens dum tipo de medicamento numa compra única, levando assim à oferta dos mesmos medicamentos a um preço mais baixo, o que é chamativo para os clientes.

Dada a situação socioeconómica do país, é de esperar que os utentes procurem os preços mais baixos, dando preferência a estes estabelecimentos em relação às farmácias. Ora, como é de esperar, cria-se o problema do não acompanhamento farmacêutico que é tão essencial para promover o uso racional e a segurança na utilização de medicamentos, favorecendo assim o aparecimento de reações adversas ou agravamento de situações já existentes, como por exemplo, pessoas com histórico de problemas no trato gastrointestinal superior ou nefropatias a tomarem AINE's sem controlo dum profissional de saúde.

É, de facto, necessário alertar a população para a aquisição de MNSRM em farmácias ou para procurarem aconselhamento farmacêutico antes da toma dos mesmos, no sentido de prevenir quaisquer efeitos indesejáveis ou reações adversas.

### **2.4.3. Rutura de stocks**

Para o bom funcionamento da farmácia e para o bom exercício da profissão, é necessário repor o *stock* da farmácia para fornecer os medicamentos necessários aos utentes, que muitas vezes necessitam de medicação diariamente, ou até mesmo várias vezes ao dia para o tratamento de certas doenças, maioritariamente crónicas.

Durante o período de estágio foram vários os medicamentos que entraram em rutura de *stock*, como por exemplo a aspirina<sup>®</sup> GR, Adalat<sup>®</sup> CR e Lasix<sup>®</sup>, que estiveram esgotados durante quase um mês no caso do primeiro, e quase dois meses no caso do terceiro. Sendo estes medicamentos de toma diária e consumidos pela maioria da população, dadas as morbilidades e co-morbilidades da mesma, é de esperar que estes nunca falem no mercado. Foram inúmeras as situações que tive de informar o utente que não tínhamos todos os medicamentos da receita, e que teria que se dirigir a outra farmácia ou então optar pelo genérico. Como são medicamentos para uso continuado e as pessoas habituaram-se às marcas originais, os utentes ficam desconfiados e reticentes a trocar para o genérico, preferindo esperar que o medicamento volte ao mercado o que podia colocar em risco a sua saúde. Para além disso, sendo eu estagiário, explicar esta situação aos utentes gerava uma certa desconfiança por parte dos utentes, sendo que os mesmos solicitavam um farmacêutico da equipa para verificar a veracidade da situação, o que gera desconforto da parte de quem atende.

O facto da farmácia fazer parte dum grupo de farmácias, permitiu muitas das vezes obter o medicamentos requerido, mas nem sempre era possível, saindo o utente prejudicado. Nestas situações, informava o utente que o melhor seria mesmo dirigir-se a um médico para encontrar uma possível alternativa terapêutica.

### **3. Casos Clínicos**

#### **3.1. Gastroenterite**

Uma senhora na casa dos 35 anos dirige-se à farmácia com queixas de diarreia e dores abdominais fortes, sinais estes que indicam uma possível gastroenterite. Começo por questionar há quanto tempo se encontra assim e se sabe a possível causa do problema, ao qual me responde que no dia anterior tinha ido jantar fora com a família, podendo a comida estar contaminada com algum vírus ou bactéria. Questiono de seguida se as fezes apresentam muco ou sangue, sendo a resposta negativa, indicando um caso de gastroenterite aguda, passível de ser controlada por terapêutica farmacológica.

Dados os sinais apresentados, comecei por indicar o Buscopan Compositum N<sup>®</sup>, que apresenta como princípios ativos o brometo de butilescopolamina e paracetamol, indicado para o alívio das dores e espasmos abdominais, devendo tomar um a dois comprimidos três vezes ao dia, não devendo exceder os seis comprimidos em 24h. [6] Como na diarreia a flora intestinal é parcialmente perdida dado o elevado número de dejeções, para a restabelecer recomendei o uso de Biofast<sup>®</sup>, um suplemento alimentar que contém dez estirpes de Bifidolactus, que funcionam como probióticos, prebióticos como fructoligosacarídeos, e ainda as vitaminas B1, B2, B6 e B12. Tomando uma saqueta por dia, este suplemento ajuda a normalizar o trânsito intestinal, reduzindo assim a intensidade e duração da diarreia. Sendo as gastroenterites bastante debilitantes por poderem causar desidratação, é imperativo garantir que os eletrólitos e fluidos sejam repostos, aconselhando a pessoa a aumentar a ingestão de líquidos, indicando a opção de poder levar também Dioralyte<sup>®</sup> que contém glicose, cloreto de sódio, cloreto de potássio e citrato disódico, repondo assim o equilíbrio eletrolítico mais eficazmente.

#### **3.2. Odinofagia e congestão nasal**

Um senhor, com cerca de 40 anos, dirigiu-se à farmácia com sintomas de odinofagia, popularmente conhecida como dor de garganta, e congestão nasal. Iniciei o atendimento por questionar há quanto tempo apresentava estes sintomas e se tinha iniciado alguma terapêutica para o tratamento dos mesmos, e ainda se tinha febre ou dificuldade ao engolir. Respondeu que tinha a sensação de ter a garganta inflamada e que lhe custava engolir, sendo então uma situação passível de ser tratada com terapêutica para alívio da dor.

Dados os sintomas, e questionando se era diabético ou não, aconselhei a toma de Streptfen<sup>®</sup> devido às propriedades analgésicas e anti-inflamatórias do seu princípio ativo – flurbiprofeno – aconselhando a dissolver na boca uma pastilha a cada 3 a 6 horas e alertando

para a dose máxima de 5 pastilhas por dia, desaconselhando o uso simultâneo de ibuprofeno, dado haver risco de sobredosagem. **[7]**

Para o tratamento da congestão nasal, indiquei o uso de Nasorhinathiol<sup>®</sup>, cujo princípio ativo é o cloridrato de oximetazolina. Este medicamento de pulverização nasal tem a posologia de 1 a 2 nebulizações, em cada narina, de 12 em 12 horas com a duração de tratamento não superior a três dias. **[8]**

#### **4. Considerações Finais**

Após o término do período de estágio em farmácia comunitária na Farmácia Machado, concluo que este é um ponto extremamente importante no nosso percurso acadêmico enquanto futuros profissionais de saúde especialistas do medicamento, onde percebemos realmente o papel do farmacêutico na sociedade.

Atualmente a farmácia é um local onde o profissionalismo, a competência, o respeito e a promoção do uso racional do medicamento a distinguem dos outros locais de saúde onde ocorre dispensa de medicamentos e produtos de saúde. Um local em constante mudança, onde o dinamismo e a inovação são fulcrais para superar os desafios do dia-a-dia.

Ao longo do estágio, e com a excelente equipa que me acompanhou neste período, senti que desenvolvi capacidades que me permitiram evoluir como pessoa e futuro farmacêutico, percebendo que ser farmacêutico é muito mais que o simples conhecimento do medicamento, mas também o conhecimento do terceiro e da sua doença, além da promoção e estabelecimento da saúde pública.

É imperativo que o farmacêutico continue a desenvolver o exercício da profissão com as competências e profissionalismo que a distinguem, para que esta seja cada vez mais reconhecida e procurada pela população dada a forte e agressiva concorrência que hoje existe com os locais de venda livre de medicamentos.

## 5. Referências Bibliográficas

[1] SNS – **Legislação de participação de medicamentos**. [Acedido a 3 de maio de 2019]. Disponível na Internet em: <https://www.sns.gov.pt/sns-saude-mais/medicamentos/>

[2] Portaria n.º 137-A/2012 do Diário da República n.º 92/2012 de 11 de Maio, Série I de 2012-05-11. [Acedido a 15 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/668307/details/maximized>

[3] Farmácias Portuguesas – **como funciona**. [Acedido a 15 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/sauda/como-funciona>

[4] Glintt® – **Consultoria de Projeto**. [Acedido a 17 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/BusinessConsulting/Paginas/Consultoria-de-Projeto.aspx>

[5] Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto, do Diário da República n.º 156/2005, Série I-A de 2005-08-16. [Acedido a 18 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/243692/details/maximized>

[6] INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento Buscopan Compositum N<sup>o</sup> 1,5 mg, comprimido**. [Acedido a 19 de maio de 2019]. Disponível na Internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=1293&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=1293&tipo_doc=rcm)

[7] INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento Strepfen<sup>o</sup> 8,75 mg, pastilhas**. [Acedido a 19 de maio de 2019]. Disponível na Internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=53219&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=53219&tipo_doc=rcm)

[8] INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento Nasorhinathiol<sup>o</sup> 0,5 mg/ml, solução para nebulização nasal**. [Acedido a 19 de maio de 2019]. Disponível na Internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=6014&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6014&tipo_doc=rcm)

## Parte II

Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.



## **Lista de Abreviaturas**

**AIM** – Autorização de introdução no mercado

**AR** – Assuntos Regulamentares

**CAM** – Comissão de Avaliação do Medicamentos

**CFT** – Classificação farmacoterapêutica

**DAM** – Direção de Avaliação de Medicamentos

**OMCL** – Laboratórios Oficiais de Controlo de Medicamentos

**SMUH - ALTER** – Sistema de gestão de Medicamentos de Uso Humano – Submissão eletrónica de pedidos de alteração aos termos de AIM

**SWOT** – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities e Threats*

**UMM** – Unidade de Manutenção no Mercado

## I. Introdução

O setor farmacêutico engloba várias vertentes profissionais, como a farmácia de oficina e hospitalar, indústria farmacêutica, análises clínicas, investigação laboratorial, entre outras. Dada a sua diversidade, e com a possibilidade de ganhar experiência e outras valências ao realizar outro estágio além do único obrigatório, farmácia de oficina, decidi candidatar-me à vaga na Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM) do INFARMED, I.P. - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde.

O INFARMED, I.P. tem a função de supervisionar e regular os setores dos medicamentos de uso humano e produtos de saúde, que inclui dispositivos médicos, produtos cosméticos e de higiene corporal, garantindo o acesso destes com qualidade, segurança e eficácia à população portuguesa, visando assim a proteção da saúde pública. [1]

O estágio possibilitou o contacto com a área de Assuntos Regulamentares (AR), um setor bastante complexo da atividade farmacêutica, permitindo conhecer o papel desta instituição a nível nacional e internacional, e mais concretamente as suas funções na regulamentação de medicamentos para uso humano.

O período de estágio teve a duração de 3 meses, tendo exercido a função de gestor de processos de alterações à Autorização de Introdução no Mercado (AIM), na Unidade de Manutenção no Mercado (UMM) da DAM, com a orientação de uma Técnica Superior (Farmacêutica). Tive a oportunidade de analisar e gerir processos de pedidos de alteração do tipo IA, IB e II à AIM de medicamentos pertencentes à classificação farmacoterapêutica (CFT) 9, e ainda de processos submetidos após decisão da Comissão Europeia relativa à arbitragem do artigo 31º dos medicamentos antagonistas dos recetores da angiotensina II (sartans) “candesartan, irbesartan, losartan, olmesartan e valsartan” de uso humano.

O relatório que se segue tem como objetivo fazer uma análise retrospectiva deste estágio, sendo realizado através duma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*), destacando os objetivos cumpridos e por cumprir, assim como os pontos relevantes que serviram para aprofundar o meu conhecimento no setor de Assuntos Regulamentares.

## **2. Análise SWOT**

### **2.1. Pontos Fortes**

#### **2.1.1. Funcionamento do INFARMED I.P.**

O funcionamento interno do instituto foi, sem dúvida, um ponto forte do meu estágio. O seu nível de organização permitiu uma rápida integração na equipa de trabalho, dando-nos a conhecer numa pequena apresentação toda a estrutura e equipa do INFARMED I.P., das suas áreas de atuação e em que iria consistir o nosso estágio. Os estagiários foram divididos entre dois departamentos, tendo eu ficado na UMM da DAM.

Nos primeiros dias de estágio tivemos formação, onde fizeram uma abordagem geral da área de AR, que tipos de alterações existem e como as submeter, explicando quais seriam as nossas funções no período de estágio.

Assim, a formação e orientação contínua criou um ambiente dinâmico na aquisição de conhecimentos nesta área, fomentando o desenvolvimento de capacidades pessoais e profissionais.

#### **2.1.2. Diversidade/multiplicidade de tarefas**

A UMM tem a competência de analisar a documentação submetida pelas entidades que pretendem alterar, renovar, declarar ou revogar caducidade de registos ou AIM de medicamentos. [2]

Enquanto estagiário nesta unidade, as minhas funções passaram por analisar a documentação que era submetida pelos titulares de AIM (TAIM) que pretendiam realizar alterações às suas AIM da CFT 9, ou seja, de medicamentos do aparelho locomotor. Para além disso, a decisão da Comissão Europeia C (2019) 2698 de 2 de abril de 2019 relativa à arbitragem do artigo 31º dos medicamentos antagonistas dos recetores da angiotensina II (sartans) “candesartan, irbesartan, losartan, olmesartan e valsartan” de uso humano, levou a que todos os TAIM submetessem de um pedido de alteração adicional na categoria C.I.II.a tipo IAin. [3] Este tipo de alteração era bastante diferente das que estava a analisar até então, permitiu o contacto com empresas a nível europeu e também com um novo sistema eletrónico, o CTS.

Esta foi uma das mais-valias para o meu estágio, pois tive a oportunidade de adquirir novas valências dentro da área de AR, além de poder contactar com empresas internacionais e como funcionam as alterações a nível dos Estados Membros de Referência.

### **2.1.3. Competências adquiridas na área de AR**

A área de AR é bastante complexa e são precisos alguns anos para um profissional ganhar capacidades e experiência suficiente para realizar as tarefas autonomamente.

Neste primeiro contacto com a área regulamentar, com a orientação dum profissional já experiente que me formou e cedeu material de apoio como leis e *guidelines*, recomendações nacionais e europeias, *sites* informativos, entre outros, consegui adquirir um vasto leque de valências, experiência e conhecimento que me serão bastante úteis para o futuro, uma vez que a área de AR me suscita bastante interesse enquanto futuro profissional.

Apesar de estar sob orientação dum profissional, este nem sempre estava disponível, o que fomentou a minha organização pessoal para ao analisar os vários processos, conseguisse saber e explicar-lhe em que cada um consistia, esclarecer possíveis dúvidas, e reter qual o próximo passo a seguir em cada situação, respondendo aos TAIM ou finalizando os processos, situação que foi vantajosa no sentido de saber organizar-me de modo a otimizar o trabalho realizado.

### **2.1.4. Material informático / Software**

No início do estágio foram disponibilizados a cada um dos estagiários credenciais para iniciar sessão e ter acesso às plataformas utilizadas por todos os colaboradores do INFARMED, I.P., possibilitando a realização do trabalho de forma eficaz.

De todas as ferramentas utilizadas, destaco o SMUH-ALTER, GIMED e CTS. O portal SMUH-ALTER permite às empresas submeterem os pedidos de alteração com a respetiva documentação, e aos gestores dos processos de AIM que trabalham neste instituto, avaliarem essa informação, validarem-na e finalizar o processo em questão. Além disso, tem acoplado o sistema de gestão financeira do INFARMED, I.P., que permite o pagamento das respetivas taxas pelo portal. O GIMED permite ter acesso a um resumo geral dos dados do medicamento, qual o seu TAIM, o estado da AIM, a cadeia de produção, embalagens, entre outros. Já o CTS foi utilizado para analisar processos de *worksharing* e que têm Portugal como Estado Membro de Referência.

A utilização destas plataformas foi uma mais-valia pois facilita tanto o trabalho das empresas, como o dos gestores do INFARMED, I.P. na análise de um pedido de alteração e da documentação que é submetida com este, bem como a troca de informação decorrente desta atividade, permitindo conhecer quais os requisitos necessários para realizar a validação do processo, finalizando-o.

## **2.2. Pontos Fracos**

### **2.2.1. Complexidade dos Processos e Tempo de Espera**

A submissão de uma alteração leva a que sejam enviados documentos, os quais são analisados pelos gestores de processos de alterações à AIM. A base destes documentos é a mesma, no entanto, consoante o tipo de alteração em questão, estes podem ter mais ou menos informação, ou até terem que ser submetidos outros documentos.

Mesmo com o apoio da minha orientadora e dos outros colaboradores da equipa, quando era confrontado com um pedido de alteração mais complexo, haviam documentos extensos e complexos, em que era preciso a análise mais minuciosa e pormenorizada, o que levava a um maior dispêndio de tempo em apenas um processo, e caso tivesse que fazer um pedido de elementos, as empresas tinham 30 dias para enviar os documentos solicitados. Tudo isto levava ao adiamento da análise de novos processos, e ao acumulo de processos em fase de resolução.

Considero assim que a complexidade de alguns processos, assim como o tempo de espera das respostas aos pedidos de elementos como uma fraqueza pois os processos em fase de resolução foram-se acumulando ao longo do estágio, deixando ainda alguns pendentes no término deste.

### **2.2.2. Autonomia/ Dependência de outros profissionais**

Como já referi anteriormente, a área de AR é bastante complexa, e muitos dos processos de alterações às AIM submetidos requerem uma grande experiência e conhecimento para serem avaliados mais eficazmente. Muitas das vezes ao analisar um processo, e devido à minha falta de experiência, tinha que solicitar a ajuda da minha orientadora para questionar se um documento estava de acordo com a *guideline*, se teria que fazer um pedido de elementos, quais os passos a seguir para aquela situação em específico, e se podia finalizar o processo, o que dependia da sua disponibilidade. Além disso, importa referir que sempre que era preciso realizar um pedido de elementos e entrar em contacto com o TAIM para algum esclarecimento, eu não tinha acesso às credenciais para enviar um *email* diretamente, tendo que enviá-lo para a minha orientadora, e só depois seguia para a empresa em questão.

Esta dependência de outros profissionais foi diminuindo ao longo do estágio, apesar de em certas situações particulares e mesmo para seguimento do meu trabalho, muitas vezes solicitar a ajuda da orientadora. Esta particularidade pode ser resolvida pela constante

formação na área e um grande investimento de tempo, ganhando autonomia para concluir as tarefas.

Considero, portanto, esta situação como um ponto negativo do estágio apesar de, em algumas situações, ter a ajuda dum profissional experiente também foi benéfico para mim, pois pude compreender melhor os procedimentos e os processos, construindo uma base sólida para a resolução dos mesmos.

### **2.2.3. Período de estágio reduzido**

Apesar de ter tirado o máximo deste estágio, considero que o tempo deste não se encontra adequado, uma vez que devido à complexidade da área de AR e da gestão dos processos, é necessário um largo período de tempo para adquirir os conhecimentos básicos para o exercício da atividade que realizei ao longo do estágio.

A avaliação e finalização dos processos demoram algum tempo, e caso seja preciso fazer algum pedido de elementos para resolve-los, prolonga o tempo dedicado a um só processo. Apesar de nos conseguirmos organizar e avaliar vários processos ao mesmo tempo, estes tempos de espera entre troca de informação e resposta dos TAIM condiciona o estágio, uma vez que temos apenas três meses para absorver todo o conhecimento possível.

Assim, três meses não dão margem suficiente para adquirir conhecimento e experiência suficiente para desenvolvermos autonomia na resolução das tarefas, além do facto de nos restringir a apenas um departamento, sendo esta uma fraqueza do estágio.

## **2.3. Oportunidades**

### **2.3.1. Visão interna da autoridade regulamentar**

O INFARMED, I.P., autoridade nacional do medicamento, resultante da sua função e competências, é uma excelente fonte de informação e conhecimento para todos aqueles que lá trabalham e realizam estágios curriculares e autopropostos.

A experiência e valências adquiridas permitem uma aplicação não só do lado da autoridade nacional, mas também do lado da indústria farmacêutica. Ao analisarmos os processos de alteração à AIM, compreendemos a estrutura e o funcionamento da avaliação e resolução dos mesmos, fornecendo as ferramentas essenciais para mais tarde ingressarmos na área regulamentar.

A evolução e atualização constante ao longo do estágio, além de todo o conhecimento adquirido na análise de pedidos de alteração às condições AIM do lado da autoridade

regulamentar foram sem dúvida uma grande oportunidade para me preparar para o futuro, considerando o INFARMED, I.P. uma excelente escola para profissionais.

### **2.3.2. Reuniões da Comissão de Avaliação do Medicamentos (CAM)**

Durante o período de estágio no INFARMED, I.P., foi-nos possibilitada a presença em duas reuniões da CAM. Esta é uma comissão técnica especializada que tem a competência de sempre que solicitado pelo Conselho Diretivo do INFARMED, I.P., emitir pareceres, no que diz respeito a medicamentos, em questões de avaliação da qualidade, segurança e eficácia, bem como outros assuntos de carácter técnico-científico.

Considero que a presença nestas reuniões foi uma oportunidade de ficar a conhecer como são solucionadas as questões levantadas pela avaliação de um medicamento, quer seja um pedido de AIM ou uma alteração à AIM, qual o papel de um técnico avaliador, seja farmacêutico ou não, e que este necessita de bastante experiência e informação científica, e ainda o papel da comissão em emitir pareceres referentes às questões submetidas.

### **2.3.3. Visita ao laboratório da Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ)**

No final do estágio o INFARMED I.P. proporcionou aos estagiários uma visita ao seu laboratório de controlo de qualidade dos medicamentos, produtos cosméticos e dispositivos médicos. Este faz parte da rede europeia de Laboratórios Oficiais de Controlo de Medicamentos (OMCL), criada pela Comissão Europeia e atualmente sob coordenação da Direção Europeia da Qualidade dos Medicamentos e Cuidados de Saúde (EDQM).

Na visita foi-nos dado a conhecer os departamentos do laboratório, o da Biologia e Microbiologia e da Química e Tecnologia Farmacêutica, assim como as tarefas realizadas por cada um. Deram-nos uma breve explicação de como filtram os medicamentos a analisar a cada ano e qual o método e material a utilizar. Para além disso, fiquei a conhecer a relevância deste laboratório a nível nacional e internacional, como membro da rede OMCL, permitindo a partilha de informação, recursos e resultados, o que harmoniza e otimiza as diversas metodologias utilizadas pelas autoridades nacionais competentes. [4]

Considero, assim, uma oportunidade para o meu estágio uma vez que fiquei a conhecer como funciona a rede Europeia de laboratórios e a importância deste instituto como membro dessa rede, assim como as funções e competências de cada departamento.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. Falta de recursos humanos**

A DAM é composta sensivelmente por 80 profissionais, no entanto, apenas 15 fazem parte da UMM, sendo que só estes estão ao encargo de gerir e avaliar os pedidos de alteração às AIM.

Posto isto, assim que a minha orientadora definiu alguns processos para eu analisar, eram vários os que já estavam para ser avaliados desde 2014 e 2015. Contactando pela primeira vez com processos de pedido de alterações, vi-a o meu trabalho dificultado porque não sabia se já tinham sido feitos pedidos de elementos para alguns processos já analisados ou se estes podiam ser finalizados, e também muitas das vezes a informação já estava desatualizada, tendo os TAIM submetido outras alterações que se sobrepunham àquela. Além disso, a minha orientadora estava com imenso trabalho acumulado e a analisar esses mesmos processos, dentro da CFT com que esta trabalhava, o que diminuía a sua disponibilidade para seguir o meu trabalho.

Considero assim a falta de recursos humanos como uma ameaça, uma vez que contactei com processos antigos, desatualizados, que atrasaram a minha evolução e me prendaram de pegar em processos mais recentes e que eram seguidos unicamente por mim. Sinto que se abrissem mais concursos públicos para contratar recursos humanos este problema era colmatado.

### **2.4.2. Tempo de Aprendizagem**

A área de AR é bastante complexa, levando a um profissional desta área bastantes anos a adquirir conhecimentos e experiência para realizar as suas funções com completa autonomia. Assim, este estágio com a duração de apenas três meses serviu apenas para conhecer uma pequena parte da área de AR, apesar de ter sido possível concluir a necessidade que os profissionais têm em manter-se constantemente atualizados e informados, em formação contínua, uma vez que esta é uma área bastante dinâmica e em constante mudança.

Este ponto foi uma ameaça ao meu estágio pois para desenvolver as minhas competências e cumprir os objetivos propostos é necessário um elevado investimento temporal, o que não é conseguido durante o período de estágio.

### **2.4.3. Processos mal submetidos pelos TAIM**

Os TAIM para alterarem as condições AIM de um medicamento necessitam de submeter um pedido de alteração das mesmas, que é avaliado pelos gestores de processos do

INFARMED, I.P. Dependendo do tipo de alteração que querem realizar, têm que cumprir condições ou submeter certos documentos de acordo com o que está indicado nas *guidelines*, e é a partir da avaliação destes componentes que o processo é validado e posteriormente finalizado, ou não.

Foram várias as situações em que ao analisar um processo a informação submetida estava desatualizada, havia documentos mal preenchidos e correspondentes a outros medicamentos ou com outras dosagens do mesmo TAIM, e principalmente não era submetida toda a documentação para validar o processo. Para solucionar o problema, faziam-se pedidos de elementos à empresa, a qual tinha trinta dias úteis para responder, sob pena de o INFARMED, I.P. invalidar o processo. Aliado ao reduzido período de estágio, este tempo de espera aos pedidos de elementos em adição ao tempo despendido ao avaliar toda a documentação do processo, prolongava em muito o tempo que se aplicava a um único processo, o que não permitia avaliar outros processos.

Considero assim como uma ameaça ao estágio a má submissão de processos pelos TAIM, uma vez que esta situação levava a longos tempos de espera para a finalização dum único processo, restringindo o ganho de conhecimento e experiência ao não avaliar outros pedidos de alteração.

### **3. Considerações Finais**

A realização deste estágio curricular no INFARMED, I.P. foi uma experiência bastante gratificante e prestigiante para mim, pelo facto de ter enriquecido em muitos níveis o meu conhecimento na área de AR, área de grande interesse pessoal.

Os profissionais do INFARMED, I.P. têm a possibilidade de ter um contacto estreito com a indústria farmacêutica e ainda com comissões científicas nacionais e internacionais, o que me permitiu captar grande conhecimento a nível regulamentar, além de ficar a conhecer como esta área realmente funciona, completando a matéria lecionada na unidade curricular de AR, que faz parte do plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Todo o apoio dado pelos profissionais do departamento da UMM, e a confiança na tomada de decisões e realização de tarefas de elevada importância dada pela minha orientadora, além das condições oferecidas pelo instituto, foram uma mais-valia para o meu percurso ao longo do estágio, que me permitiram desenvolver as tarefas eficazmente, ganhando experiência e conhecimento nesta área importantíssima do setor farmacêutico. Estagiar neste prestigiado instituto foi deveras importante para o meu enriquecimento pessoal e profissional, e tenho a certeza que ajudará a ser um profissional bem sucedido.

#### 4. Referências Bibliográficas

[1] INFARMED, I.P. – **Apresentação**. [Acedido a 30 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao>

[2] INFARMED, I.P. – **Direção de Comprovação da Qualidade**. [Acedido a 30 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/dam>

[3] INFARMED, I.P. – **Decisão da Comissão Europeia C (2019) 2698**. [Acedido a 30 de julho de 2019]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/documents/15786/2323424/Decis%C3%A3o\\_Candesartan\\_irbesartan\\_losartan\\_olmesartan\\_valsartan/bcc8e631-90e2-4599-b928-c6c1988575d5](http://www.infarmed.pt/documents/15786/2323424/Decis%C3%A3o_Candesartan_irbesartan_losartan_olmesartan_valsartan/bcc8e631-90e2-4599-b928-c6c1988575d5)

[4] INFARMED, I.P. – **Direção de Avaliação de Medicamentos**. [Acedido a 30 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/dcq>

## **Parte III**

Monografia: “Conexina 43 no cancro da mama: papel fisiopatológico e potencial terapêutico”

## **Resumo**

As conexinas são proteínas com funções de adesão e comunicação intercelular, com papéis relevantes no desenvolvimento, diferenciação e homeostase dos vários tecidos em vertebrados. Dos 21 membros da família da conexina humana, o subtipo 43 (Cx43) é o mais amplamente expresso. As conexinas têm sido descritas como tendo um papel na patogênese do cancro de mama que em todo o mundo, é o mais comum a afetar o sexo feminino, devendo as suas taxas de incidência e mortalidade aumentar significativamente nos próximos anos. A progressão do tumor primário é geralmente acompanhada de uma sub-expressão de conexinas, com subsequente perda da comunicação intercelular juncional. Nos estádios avançados do cancro, as conexinas são sobre-reguladas, ajudando as células tumorais a interagir com as células endoteliais e assim a extravasar e invadir tecidos distantes. Devido à sua interação diferencial com o microambiente tumoral, a Cx43 pode atuar como supressor tumoral no crescimento precoce do cancro de mama e também funcionar como potenciador tumoral em estádios avançados. Devido à expressão diferencial e às funções das conexinas nos vários estádios da carcinogénese da mama, a sobre-expressão da Cx43 ou o restauro da sua capacidade de se localizar nas junções gap, poderá ser uma potencial estratégia terapêutica para impedir a progressão do tumor, mantendo as células em estados mais diferenciados.

**Palavras-chave:** Cancro da Mama, Conexina 43 (Cx43), Junção Gap, Comunicação Intercelular, Sub-regulação, Sobre-regulação, Progressão Tumoral, Metastização, Estratégias Terapêuticas.

## **Abstract**

Connexins are proteins with functions of adhesion and intercellular communication, with relevant roles in development, differentiation and homeostasis of the various tissues in vertebrates. Of the 21 family members of the human connexin, subtype 43 (Cx43) is the most widely expressed. Connexins have been described as having a role in the pathogenesis of breast cancer, which worldwide is the most common affecting females, and their incidence and mortality rates are expected to increase significantly in the coming years. Primary tumor progression is usually accompanied by connexin downregulation, with subsequent loss of junctional intercellular communication. In the advanced stages of cancer, connexin upregulation helps tumor cells to invade and interact with endothelial cells, and to extravasate to distant tissues. Due to its differential interaction with the tumor microenvironment, Cx43 can act as a tumor suppressor in the early stages, and also function as tumor enhancer at advanced stages of breast cancer. Due to the differential functions and levels of expression of connexins at various stages of breast tumorigenesis, targeting Cx43 in order to up-regulate or restore its ability to localize at the gap junction, could be a potential therapeutic strategy to prevent tumor progression, remaining as cells in more differentiated states.

**Keywords:** Breast Cancer, Connexin 43 (Cx43), Gap Junction, Intercellular Communication, Upregulation, Downregulation, Tumor Progression, Metastization, Therapeutic Strategies.

## **Lista de abreviaturas**

**AC** – Ansa Citoplasmática

**AE** – Ansa extracelular

**CM** – Cancro da Mama

**CMTN** – Cancro da Mama Triplo Negativo

**C-Src** – Proteína-tirosina cinase Src

**Cx** – Conexina

**GJ** – Junção gap

**HC** – Hemi-canal

**HER2** – Recetor do fator de crescimento epidermal humano 2

**kDa** – Kilo Dalton

**mRNA** – RNA mensageiro

**PK** – Proteína cinase

**PM** – Peso Molecular

**RE** – Recetor de estrogénios

**RP** – Recetor de Progesterona

**SiRNAs** – pequenos RNAs de interferência

**SUMO** – pequeno modificador semelhante à ubiquitina

**TC** – Terminal carboxilo

**TN** – Terminal amina

**Ub** – Ubiquitina

**V-Src** – proteína-tirosina cinase Src do vírus do sarcoma de Rous

**ZO-1** – Zonula Occludens-1

**ΨCx43** – Pseudogene Cx43

## I. Introdução

O cancro da mama (CM) é o segundo tipo de cancro mais comum no mundo e nas mulheres em países desenvolvidos. É necessário ter em consideração a divisão do CM em tipos biológicos para qualificarmos adequadamente os doentes para tratamento. A deteção precoce para melhorar o prognóstico e a sobrevivência do CM, continua a ser a base e objetivo da terapêutica do CM.

As conexinas (Cxs) são um dos principais componentes das Gap Junction (GJ) que ligam diretamente o citoplasma de duas células adjacentes, permitindo a comunicação intercelular, e apresentando papéis relevantes no desenvolvimento, diferenciação e homeostase dos vários tecidos em vertebrados, sendo a regulação da sua expressão e montagem em GJ processos complexos, encontrando-se espacial e temporalmente regulada durante diferentes estádios da tumorigénese. [1]

A função e a expressão anormal da Cxs estão implicadas na irregularidade do desenvolvimento e em múltiplos tipos de cancro. As Cxs funcionam como reguladores principais que determinam a progressão tumoral e metástases pela troca de sinais, e coordenação da comunicação entre diferentes tipos de células dentro da população de células tumorais heterogéneas e entre as células tumorais e o seu microambiente. [2]

Enquanto a Cx43 é sub-regulada em muitos tumores primários, ela é sobre-regulada durante os estádios posteriores da carcinogénese mamária. Evidências científicas sugerem que a comunicação intercelular mediada por GJ e a expressão de Cxs, as suas sub-unidades proteicas, estão ligadas à tumorigénese e à progressão para metástases. Vários estudos também sugerem que comunicação intercelular e Cxs contribuem para a supressão do crescimento tumoral, participando na regulação da proliferação, diferenciação e morte celular.

A metastização do cancro é um processo de múltiplas etapas, envolvendo a invasão do endotélio, o intravasamento (das células para a corrente sanguínea) e o seu extravasamento (da corrente sanguínea para tecidos distantes). Foi demonstrado que a Cx43 parece ter também um papel na metastização tumoral. De facto, durante a progressão do cancro, a falta de conexão entre Cxs ajuda as células tumorais a separarem-se fisicamente do microambiente e migrarem posteriormente.

A falta de GJ no tumor primário da mama poderá ser utilizada como uma intervenção terapêutica, pois a sobre-expressão ou re-expressão de Cxs pode exercer atividades anti-tumoral e anti-metastática em células do CM. No entanto, a estimulação da comunicação intercelular também parece traduzir-se num aumento do efeito de agentes quimioterápicos através da potenciação do efeito *bystander*. É, assim, necessário esclarecer mais

detalhadamente o papel fisiopatológico das Cxs, e em particular da Cx43, de modo a avaliar o seu verdadeiro potencial como alvo terapêutico nos diferentes estádios do CM.

## 2. Cancro da mama

Atualmente, o peso das doenças não transmissíveis está a aumentar por todo o mundo. Podem destacar-se como os seus principais motivos: o aumento da esperança média de vida, a exposição prolongada a fatores de risco e mudanças no estilo de vida. Estudos mostram que o cancro é uma das doenças mais importantes do mundo, devido à sua componente multifatorial numa visão epidemiológica. [3]

O CM é o mais comum entre os que mais afetam as mulheres a nível mundial, e, prevê-se que as suas taxas de incidência e mortalidade aumentem significativamente nos próximos anos. A incidência desta doença, com aproximadamente 1.7000.000 novos casos a cada ano e 458 mil mortes por ano, é alarmante; essas taxas sugerem um progresso lento em termos de prevenção.

Em 2018, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Cancro, a incidência de CM foi 2086 milhões de casos, 11,6% de todos os casos de cancro, com uma mortalidade de 627.000, 6,6% de todos os novos casos de cancro (**Anexo 1**), afetando mulheres de todas as idades. Nesse ano, em Portugal, foi atingido um número de 6974 novos casos, 12% de todos os novos casos, sendo este o mais incidente (**Anexo 2**). Relativamente à taxa de mortalidade, houve no mesmo ano 1748 mortes, 6% de todos os cancros, sendo este o quarto da lista (**Anexo 3**). [4]

O CM geralmente manifesta-se por uma anomalia mamográfica ou através de alterações físicas na mama, incluindo o aparecimento de massas ou espessamento assimétrico, secreção nos mamilos ou alterações na pele ou no mamilo. Duas manifestações clínicas incomuns incluem a doença de Paget do mamilo, uma forma de adenocarcinoma envolvendo a pele e os ductos, e o CM inflamatório, identificado por uma constelação de vermelhidão, calor e edema que frequentemente reflete a infiltração de células tumorais nos vasos linfáticos dérmicos da mama. [5-7]

Múltiplos fatores estão associados a um risco aumentado de desenvolver CM. Os principais fatores de risco são o género e a idade, uma vez que 75% de todos os CM ocorrem em mulheres com idade superior a 50 anos. Outros fatores de risco incluem aumento do risco de desenvolver CM, em 1,5% a 3%, se uma mulher tiver mãe ou irmã com histórico de CM, mutações nos genes de suscetibilidade ao CM BRCA1 e BRCA2, sendo responsáveis por 5% a 10% de todos os CM, fatores hormonais como os estrogénios endógenos, e ainda dieta e

estilo de vida, já que mulheres com um índice de massa corporal superior ou igual a 31,1 têm um risco 2,5 vezes maior de desenvolver CM do que aquelas com um índice de massa corporal inferior ou igual a 22,6. [5-10]

Considerando o peso financeiro que os países desenvolvidos apresentam, o exame físico da mama é uma forma eficaz de diagnosticar o cancro em fases precoces. Além disso, se as mulheres forem educadas sobre o CM, o auto-exame mamário pode ser um método simples e económico para prevenir a doença. Após deteção de uma anormalidade mamária palpável pelo paciente ou pelo profissional de saúde, ou de serem detetadas suspeitas num mamograma de rastreio, é realizada uma biópsia guiada por mamografia, ultrassonografia ou ressonância magnética de forma a obter o diagnóstico clínico. [6, 7]

## 2.1. Marcadores de Estádio, de Prognóstico e Preditivos

Como em todos os tipos de cancro, o estadiamento do CM é um método consistente na avaliação da extensão, de forma a orientar as decisões terapêuticas. A *American Joint Committee on Cancer* apresenta um manual de estadiamento clínico e patológico que se baseia no sistema TNM, no qual “T” se refere a tumor, “N” a nódulos e “M” a metástase. Para o CM, T refere-se à extensão do tumor no interior da mama, N à extensão dos nódulos linfáticos regionais na axila e nas cadeias mamárias supraclaviculares e internas, e M refere-se à doença metastática. Existem 5 estádios: estágio 0, que é o Carcinoma ductal não invasivo *in situ*, e os estádios I a IV, que são usados para o CM invasivo. Além do estadiamento TNM tradicional, o estadiamento do CM reflete ainda o teste de biomarcadores para a expressão do recetor de estrogénio  $\alpha$  (RE), recetor de progesterona (RP) e expressão do HER2, o grau do tumor, e no caso de neoplasias nódulo-negativas, RE-positivas e HER2-negativas, a incorporação do ensaio genómico *Oncotype DX*. [6]

Para a determinação do prognóstico, utiliza-se o Índice Prognóstico de Nottingham, que utiliza como indicadores o tamanho tumoral, número de nódulos linfáticos envolvidos, e o estágio do tumor. As duas determinantes mais importantes do prognóstico para o CM em estágio inicial são o estágio linfonodal patológico e o tamanho do tumor. Um mau prognóstico está associado a uma elevada carga linfonodal, baixo grau histológico, grande tamanho tumoral, ausência de expressão de RE e RP e sobre-expressão de HER2. [5]

Os RE, RP e HER2, além de marcadores de estágio e prognóstico, atualmente podem ser também considerados marcadores preditivos para orientar a seleção da terapêutica, devendo ser avaliados rotineiramente em todos os cancros invasivos.

## 2.2. Subtipos moleculares

Podemos classificar o CM em diferentes tipos, incluindo CM não-invasivo, invasivo e metastático, bem como em subtipos intrínsecos ou moleculares.

Técnicas moleculares modernas forneceram mais informações sobre a classificação molecular do CM. Integrando dados derivados da análise por matrizes de número de cópias de DNA genómico, metilação de DNA, sequenciamento de exões, RNA mensageiro (mRNA), sequenciamento de microRNA e arranjos de proteínas de fase reversa, foram identificados vários tipos geneticamente distintos de CM [5], tendo estas implicações terapêuticas e de prognóstico. [11]

### 2.2.1. Subtipos Luminais

Os subtipos luminais compõem a maioria dos CM e expressam genes que geralmente são expressos no epitélio luminal da mama, sendo divididos em dois subgrupos: luminal A e luminal B.

Os tumores Luminal A são mais comuns e caracterizam-se por altos níveis de expressão de genes relacionados com o RE, e ainda baixa expressão do *cluster* de HER2 e genes associados à proliferação, como o Ki-67. O seu prognóstico é o mais favorável de todos, com uma sobrevida de 80% em cinco anos.

Em contraste, os tumores Luminal B são caracterizados por níveis mais baixos de expressão de genes relacionados com RE, expressão variável do *cluster* HER2 e níveis mais elevados de genes associados à proliferação. Foram descritas taxas de sobrevida a 5 anos de 40%.

Assim sendo, os tumores Luminal A têm um prognóstico global mais favorável que os tumores Luminal B. [8, 12]

### 2.2.2. Subtipo Enriquecido em HER2

O subtipo enriquecido com HER2 compõe aproximadamente 10% a 15% de todos os CM e sobre-expressa os genes associados ao HER2 e de proliferação, tendo ainda menor expressão de genes relacionados ao RE. Curiosamente, uma análise do Programa do Atlas do Genoma do Cancro demonstrou que nem todos os cancros clinicamente positivos para HER2, como definido por uma análise imunohistoquímica e/ou hibridização *in situ*, pertencem ao subtipo molecular enriquecido em HER2 e vice-versa. A maioria dos CM clinicamente positivos para HER2 e que em relação ao perfil de expressão génica não são considerados

parte do subgrupo enriquecido em HER2, enquadram-se no subtipo luminal B. O subtipo enriquecido em HER2 é quase sempre negativo para o RE e RP. [8, 12]

### 2.2.3. Subtipos Triplo-Negativos

Os subtipos RE-negativos compõem um grupo heterogêneo de tumores que são frequentemente denominados de CM triplo negativo (CMTN), pois geralmente não possuem RE, RP e HER2. A categoria *basal-like* do subconjunto RE-negativo foi inicialmente identificada pela tecnologia de *microarray* de primeira geração, sendo caracterizada por um elevado nível de expressão de genes de proliferação e citoqueratinas basais, e ainda por uma perda de expressão de genes associados ao controlo do ciclo celular. Embora os tumores *basal-like* sejam os mais comuns dos subtipos RE-negativos (50% a 75%) e constituam 15% a 20% de todos os CM, outros subtipos negativos existem também, incluindo o grupo *claudin-low*, o de recetor de andrógeno rico em interferão e os grupos normais. Embora o subgrupo *claudin-low* tenha algumas semelhanças com o tipo *basal-like*, estes tumores têm baixa expressão dos genes de claudinas que estão envolvidos nas *tight-junctions* das células epiteliais, possuindo características similares às células estaminais com evidência de terem sofrido transição epitelial-mesenquimal. [8]

Outros investigadores tentaram caracterizar o CMTN usando perfis transcricionais, incluindo o trabalho de Lehman *et al.* (2016) [13] no qual foram identificados seis subtipos distintos. Os principais agrupamentos incluíram dois tipos basais, um imunomodulador, um mesenquimal, um mesenquimal *stem-like* e um subtipo de recetor de androgénio luminal com respostas terapêuticas distintas, que pode ter relevância translacional importante.

O CMTN representa apenas 12-17% dos CM, devendo-se esta percentagem a uma alta proporção de mortes, uma vez que é bastante agressivo. Têm uma incidência superior em mulheres jovens, afro-americanas e portadoras de uma mutação no gene BRCA1. [8, 12]

Embora a definição exata de subtipos moleculares seja uma área de debate ativo, esses subtipos são reprodutíveis em conjuntos de dados múltiplos e não relacionados, sendo que o impacto prognóstico foi validado nesses contextos. Como resultado, os ensaios clínicos são planeados subdividindo os pacientes pelo estado de RE, RP e HER2, para validar as alegações de que as opções terapêuticas devem ter em conta estes subgrupos em vez da população de pacientes com CM como um todo.

Em 2011, a Conferência Internacional do CM de St. Gallen reconheceu que o CM não deve ser tratado como uma única doença, recomendando a definição de doença por subtipo

molecular usando um teste genético ou o *status* de RE, RP ou HER2 em conjunto com marcadores de proliferação. Esta abordagem é agora reconhecida pelo consenso internacional como a melhor maneira de estratificar os pacientes para tratamento. [8]

A classificação do CM em diferentes tipos biológicos permite a aplicação abrangente de um grupo de fatores prognósticos altamente valiosos. Por conseguinte, pode aumentar a probabilidade de determinar adequadamente o grau de progressão clínica e patológica da doença, bem como facilitar a previsão os resultados do tratamento a longo prazo. [14]

Sendo o CM o principal cancro em mulheres, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento, em que a sua incidência continua a aumentar nos países em desenvolvimento devido ao aumento da esperança média de vida, ao aumento da urbanização e à adoção de estilos de vida ocidentais, e uma vez que a resistência à quimioterapia sistémica representa um grave problema, existe a necessidade de desenvolver novos agentes terapêuticos mais eficazes, sobretudo para os subtipos mais agressivos. As Cxs, e em particular a Cx43, através do seu papel celular, são potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos para esta forma de doença.

### 3. Conexinas

A descoberta de GJ e do seu papel no fornecimento de linhas diretas de comunicação entre células datam mais de 50 anos, e a pesquisa sobre o porquê de células saudáveis requererem este modo de sinalização celular continua a ser de importância crítica. A compreensão do papel das GJs na fisiologia, visa uma necessidade de nos interrogarmos acerca da família de proteínas vertebradas conhecida por formar canais intercelulares, as Cxs. A multiplicidade de Cx e a variedade de combinações entre elas permitem um imenso espectro de diversidade de canais, ditando a sua seletividade para milhares de pequenas moléculas que podem atravessar numa célula para a outra. Dada a diferente expressão de Cxs em diferentes tecidos, esta forma crítica de comunicação celular direta ocorre de uma forma específica de cada tecido. [15, 16]

Quase todos os tipos de células, excetuando as hemácias, alguns neurónios, espermatozóides e células musculares esqueléticas, comunicam através de GJ. Nos vertebrados, muitos tecidos expressam duas ou mais Cxs. [17, 18]

Até ao momento, foram identificadas 21 Cxs diferentes em humanos. A expressão dessas proteínas varia entre os tipos de células. [19] A co-expressão de múltiplos genes dentro de uma única célula, pode afetar tanto a composição de conexões ou hemi-canais (HC) e canais intercelulares, como pode fornecer um mecanismo compensatório para a perda de

uma isoforma. [20] De todos, o subtipo de 43 kiloDaltons (kDa), Cx43, é o mais amplamente expresso. [5]

### 3.1. Nomenclatura

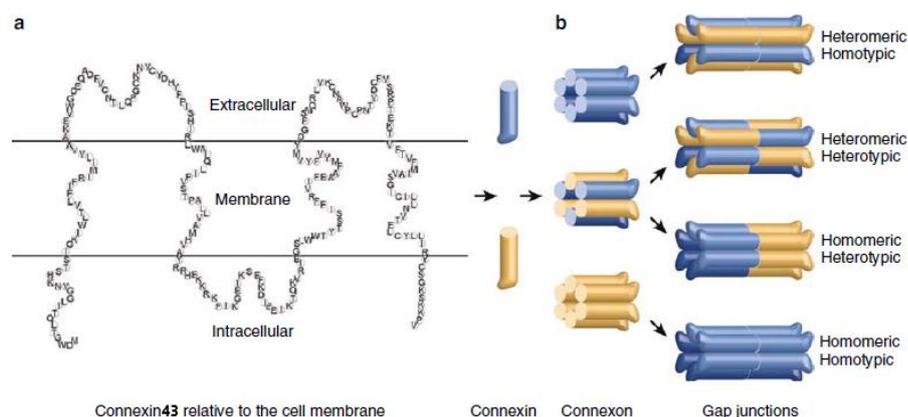
Atualmente existem duas nomenclaturas para as Cxs. Numa delas, as Cxs são nomeadas de acordo com o seu Peso Molecular (PM). Elas são abreviadas como "Cx" seguidas por um sufixo que indica o PM aproximado da proteína em kDa. Por exemplo, a Cx43 é uma Cx que tem o PM de 43 kDa. Cxs diferentes com massas moleculares semelhantes são denotadas com um ponto decimal para distingui-las, por exemplo, Cx30 versus Cx30.3 e Cx31 versus Cx31.1. Na segunda nomenclatura, as Cxs são designadas por GJ proteins e divididas em subgrupos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  com base na similaridade da sua sequência e no comprimento do domínio citoplasmático. Por exemplo, o gene da Cx43 humana é também designado como Gap Junction protein alfa I (GJA1). [15, 17, 19, 21]

### 3.2. Estrutura

As GJs são formadas nas superfícies basolaterais de duas células com intervalo de separação de 2-3 nm, conectando diretamente o citoplasma de células adjacentes. Uma GJ é composta por dois HCs. Cada conexão ou HC, por sua vez, é formada através da oligomerização hexamérica de proteínas chamadas Cxs.

As Cxs são uma família multigênica de proteínas transmembranares, sendo a unidade estrutural das GJs. Cada Cx é constituída por quatro hélices transmembranares hidrofóbicas, duas ansas extracelulares (AE-1 e AE-2), uma ansa citoplasmática (AC) e os terminais carboxilo (TC) e amina (TN) localizados no lado citoplasmático. Sendo uma família de genes e proteínas relativamente conservada, a principal diferença entre as Cxs está no comprimento e na sequência do TC citosólico. As AE-1 e AE-2 são os resíduos mais conservados e são necessárias para uma interação adequada de ancoragem do HC a partir de duas células adjacentes para o canal se formar. [18, 21-23]

No processo de formação de HCs, estes podem ser homoméricos se forem constituídos por um único tipo de proteínas da família, ou heteroméricos se forem constituídos por dois ou mais membros dessa família. Quando os HCs de duas células opostas se juntam para formar uma GJ, os canais podem ser homotípicos, onde ambos os HCs são compostos por um único tipo de Cx, ou heterotípicos, contendo HCs compostos por mais que um membro da família. [15, 19, 21]



**Figura 1:** Representação esquemática da estrutura e organização das Cxs. Adaptado de [20]

### 3.3. Funções Biológicas

A comunicação celular é importante para a manutenção da homeostase dos tecidos / órgãos em organismos multicelulares. Usando esta comunicação, as células podem sentir as diferenças nas condições ambientais e responder adequadamente. Este conceito pode envolver o envio de um sinal para as células vizinhas para gerar uma resposta coordenada, ou isolar grupos de células do resto da comunidade para manter a integridade do tecido.

As GJs ligam o citoplasma de duas células, e num estudo foi demonstrado que estes canais compostos por diferentes isoformas de Cx possuem propriedades distintas, variando na estrutura, no tamanho de poro, na dependência da voltagem, na probabilidade de abertura e na permeabilidade. [24]

A capacidade das Cxs funcionarem como canais aquosos, permitindo o acoplamento elétrico e bioquímico entre as células adjacentes, fornece um meio para a troca de pequenas substâncias com PM inferior a 1 kDa, como iões (por exemplo,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Cl^-$ ), primeiros e segundos mensageiros (por exemplo, AMPc, GMPc, inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e prostaglandina E2) e pequenas moléculas (por exemplo, glutathiona, ATP, glutamato e glicose), num processo chamado comunicação intercelular. Além disso, foi demonstrado que a transferência de pequenos RNAs de interferência (siRNAs) entre células adjacentes através de GJ é possível, embora ainda não seja claro se siRNAs são trocados normalmente *in vivo*. [17, 18, 20, 25]

Avanços substanciais têm sido feitos na compreensão do papel da comunicação intercelular e dos HCs na coordenação dos eventos celulares. Nos últimos anos, uma panóplia de estudos demonstrou um papel das Cxs em muitos eventos fisiológicos, incluindo a manutenção da homeostase tecidual, sincronização celular, diferenciação, crescimento celular

e coordenação metabólica de órgãos avasculares, incluindo a epiderme e o cristalino, e vasculares, nomeadamente no coração. [20, 26] Também pode ter um papel na difusão autócrina ou parácrina, entre o citoplasma e o meio extracelular, quando os HCs estão ativos. [27]

### 3.4. Localização e tamanho

O epitélio dos ductos mamários é composto por duas camadas de células: uma camada interna de células luminais circundada por uma camada externa de células basais, composta principalmente por células mioepiteliais, mas também por populações de células estaminais e progenitoras. Apesar de estar bem estabelecido que a Cx43 é expressa principalmente na camada basal, alguns estudos mostraram a expressão da mesma em células luminais.

Estudos adicionais realizados por Phillips *et al.* (2017) confirmaram, por coloração imunohistoquímica, a observação de que a Cx43 é predominantemente expressa no mioepitélio basal dos ductos da mama humana normal e não maligna [19, 28], e Banerjee (2016) concluiu que, de facto, a Cx43 localiza-se nas células mioepiteliais e é necessária para o bom funcionamento deste tipo de célula durante a lactação. [22] O padrão temporal da expressão de Cx na glândula mamária humana não está bem caracterizado devido à dificuldade em se obter amostras normais de tecido mamário humano em diferentes estágios de desenvolvimento. [28]

As Cxs podem formar canais não-funcionais em áreas não opostas da membrana celular, ou difundir-se livremente para regiões de contato célula a célula de forma a encontrar uma Cx parceira numa célula vizinha para completar a formação de GJ. As GJs podem ser densamente compactadas e formar placas, nas quais existem milhares de canais organizados. Estudos recentes sugerem que apenas uma pequena porção (entre 10 a 20%) destes canais estão abertos e funcionais nas placas, enquanto a maioria parece estar permanentemente fechada. Essas observações correlacionam-se com um modelo que prevê que apenas os canais recém-formados, situados na periferia da placa, são funcionais, enquanto que as partes centrais da placa, mais antigas, são não-funcionais, permanecendo fechados até serem internalizados. [16, 20, 29]

### 3.5. A importância do domínio TC

Pensa-se que o TC tenha cerca de 150 aminoácidos de comprimento (resíduos 232 a 382). Isso representa 39% de toda a proteína Cx43. É rico em arginina (9 resíduos), asparagina (11), ácido aspártico (10), prolina (13; ausente de outros domínios intracelulares) e,

particularmente, serina (22; ausente na ansa intracelular e com apenas 2 resíduos no TN citosólico). A composição rica em prolinas e serinas tem importantes consequências fisiológicas e torna essa parte da Cx43 um potencial alvo para interações de proteínas que permitem a interferência entre a Cx43 e proteínas citoesqueléticas e regulatórias, além de extensas modificações pós-traducionais que modulam o seu tráfego intracelular e a atividade do canal juncional. Tem sido demonstrado que o domínio TC contribui para as funções intracelulares, incluindo proliferação, apoptose, migração e transcrição. [19, 24]

Este domínio está envolvido na regulação do tráfego das GJs para a membrana plasmática, na sua abertura / fecho, desmontagem e degradação, bem como a nível da comunicação intercelular através de várias modificações pós-traducionais e interações com outros parceiros proteicos. O domínio TC é intrinsecamente desordenado, tornando-o um substrato ideal para a regulação da sinalização intercelular, facilitando a interação com muitos parceiros de alta especificidade e de baixa afinidade. [18]

### 3.5.1. Modificações pós-tradução da Cx43

Várias modificações pós-tradução incluem a fosforilação, ubiquitinação, nitrosilação, hidroxilação, acetilação, metilação e SUMOilação da Cx43, sendo conhecidas por influenciar direta ou indiretamente a comunicação intercelular e, portanto, influenciando a internalização de GJ e formação de vesículas de GJ anelares. [18]

#### Fosforilação

A fosforilação reversível e dinâmica de proteínas é considerada como um mecanismo fundamental na regulação de essencialmente todas as funções celulares, incluindo a comunicação intercelular, apesar dos mecanismos exatos permanecerem incertos. A Cx43 e muitas outras Cxs são fosfo-proteínas e a maioria, se não todas as etapas no seu ciclo de vida, são reguladas via fosforilação / desfosforilação por várias cinases. Os eventos de fosforilação de Cx43 podem ocorrer após de 15 min de síntese e várias cinases parecem afetar a montagem das GJs. [29, 30]

Pelo menos 19 das 26 serinas e 2 dos 6 resíduos de tirosinas localizados no TC da Cx43 são conhecidos como sendo fosforilados *in vivo* que resultam na regulação positiva ou negativa de comunicação intercelular. [18, 29] A fosforilação do TC regula a comunicação intercelular por meio de vários mecanismos, incluindo o controlo do canal da GJ, tráfego de Cx, montagem de HCs em GJ, e a endocitose e degradação das mesmas. [31]

São exemplo de fosforilações que inibem a comunicação intercelular:

O fator de crescimento epidérmico inibe rapidamente a comunicação intercelular pela indução da fosforilação da Cx43 mediada pela proteína cinase ativada por mitógenos. Além de modular as propriedades de propagação dos canais GJ-Cx43, o fator de crescimento epidérmico também pode aumentar a endocitose e a degradação da Cx43.

A proteína-tirosina cinase Src (v-Src), assim como a sua contraparte viral, a c-Src, e a tirosina cinase 2, fosforilam o TC da Cx43, estando associadas à inibição da comunicação intercelular. [24] Também foi identificado que a fosforilação do domínio TC da Cx43 pela c-Src inibe a interação direta entre a  $\beta$ -catenina e esse mesmo domínio. [32]

A cinase I dependente de ciclina induz a fosforilação de Cx43 durante a mitose, que se correlaciona com a perda de comunicação intercelular.

Níveis elevados de AMPc intracelular aumentam a comunicação intercelular e estão associados ao aumento da fosforilação de várias isoformas da Cx, incluindo a Cx43. O aumento da comunicação intercelular induzido por AMPc é mediado pela proteína cinase A (PKA) e envolve um aumento do tráfego de Cx43 para a membrana plasmática e reforço da montagem de GJ. [24, 31]

#### Ubiquitinação

A ubiquitinação da Cx43 tem sido descrita desde há 20 anos, estando o seu papel na sinalização da degradação da Cx43 proteossomal bem estabelecido. Até ao momento, os poucos resultados publicados indicam que múltiplas mono-Ubs estão ligadas a Cxs, e muito recentemente foi demonstrado que a K63-poli-ubiquitinação também se associa a estas. Sabe-se que a poli-ubiquitinação ligada a K63 sinaliza o tráfego intracelular, bem como a degradação endo- e fago-lisossomal. Isso sugere que a K63-poli-ubiquitinação da Cx43 também pode desempenhar um papel na internalização da GJ. [18]

Demonstrou-se que a Cx43 interage com as proteínas de ligação à ubiquitina Eps15 e p62, que estão envolvidas na mediação da degradação da Cx43 pela autofagia, e ainda com a Tsg101, que está envolvida na mediação da degradação da Cx43 através da via endo-lisossomal.

Várias ligases de ubiquitina E3 demonstraram estar envolvidas na regulação da degradação da Cx43 e dos níveis de GJ. A E3 ubiquitina ligase NEDD4 liga-se ao TC da Cx43 e medeia a degradação de Cx43 por autofagia. [24]

#### SUMOilação

A Cx43 pode ser modificada pós-traducionalmente pelo “pequeno modificador relacionado com a ubiquitina” (*Small Ubiquitin-related MOdifier*, SUMO). Verificou-se que todas



### Ligação e libertação de ZO-1

Uma função chave da ZO-1, pertencente à família de proteínas de estruturação com múltiplos domínios, conhecidas como guanilato cinases associadas à membrana, é organizar os componentes proteicos das junções aderentes e ligá-los ao citoesqueleto de actina cortical, mantendo a sua integridade. A evidência experimental disponível sugere que a ZO-1 está envolvida na remodelação dinâmica das GJs da Cx43 sob condições fisiológicas e fisiopatológicas.

A interação entre Cx43 e ZO-1, que ocorre diretamente através dos últimos 4 resíduos do TC da Cx43 e o domínio de ligação PDZ-2 da ZO-1, é regulada negativamente pela fosforilação de Cx43 na Ser373 dependente da Akt. Este enorme complexo proteico protege a superfície citoplasmática das GJs e, portanto, precisará de ser removido das mesmas antes que outras proteínas (cinases, fosfatases, E3-ubiquitina ligase) possam ter-lhes acesso e permitam modificações reguladoras subsequentes na Cx, incluindo a transformação de GJ para internalização. [18, 24, 33]

### Drebrina

A drebrina, proteína de ligação a actina, foi recentemente identificada como um parceiro de interação direta com a Cx43 e o seu *knockdown* resulta num aumento da degradação de Cx43 e perda de GJ funcionais, sugerindo que esta proteína desempenha um papel na manutenção de GJ num estado funcional na membrana plasmática. [24]

Os resíduos K259-T275, S282-N295 e N302-R319 da Cx43 interagem com drebrina, ajudando a Cx43 a interagir diretamente com a F-actina, estabilizando-a para favorecer a comunicação intercelular. [18]

A Src fosforila o resíduo Y265 do TC da Cx43, inibindo a interação desta com a drebrina. A depleção de drebrina resulta em comunicação intercelular prejudicada, visando também a degradação de Cx43. [32]

O TC da Cx43 também interage com reguladores do crescimento, de diferenciação e migração celular, tais como:

### $\beta$ -catenina

Uma proteína que foi identificada por modular tanto a expressão da Cx43, como a comunicação intercelular, é a  $\beta$ -catenina. Esta proteína é um transdutor de sinal intracelular na cascata de transdução de sinalização Wnt canónica, que está envolvida na regulação e

coordenação da adesão célula-célula e transcrição génica. Foi identificado que, em resposta à sinalização Wnt, a  $\beta$ -catenina interage com o gene Gap Junction protein alfa I da Cx43. [32]

A interação  $\beta$ -catenina ocorre nos resíduos semelhantes àqueles que interagem com a drebrina. Uma semelhança destas proteínas é que ambas ajudam a Cx43 a interagir indiretamente com a F-actina, estabilizando as GJs para favorecer a comunicação intercelular. [18]

Em células epiteliais normais, a  $\beta$ -catenina associa-se à membrana celular com a molécula de adesão E-caderina (fenótipo epitelial), enquanto que qualquer  $\beta$ -catenina citoplasmática livre é fosforilada e direcionada para a degradação dependente de ubiquitinação, impedindo assim que atinja o núcleo, onde geralmente promove proliferação celular, angiogénese, invasão, motilidade, diferenciação e renovação de células estaminais. Quando existe  $\beta$ -catenina em excesso, esta é translocada para o núcleo, onde atua como coativador transcricional de diversos genes alvo, como os fatores de transcrição potenciadores de células T e linfóide, e genes de transição epitelial-mesenquimal, ocorrendo este tipo de transição nestas células (fenótipo mesenquimal). Esta transição está envolvida na progressão tumoral e formação de metástase. De facto, CM malignos e invasivos estão associados a uma sobre-expressão de  $\beta$ -catenina, onde uma sobre-expressão de Cx43 desloca a  $\beta$ -catenina para fora do núcleo, translocando-a para a membrana favorecendo a transição mesenquimal-epitelial. [1, 34]

### CCN3 (NOV)

A proteína CCN3 (NOV), pertencente a uma família de proteínas multimodulares envolvidas em diversas funções celulares, incluindo adesão celular, migração e proliferação, interage com o TC da Cx43 e localiza-se nas GJs. No entanto, o(s) local(is) específico(s) de interação entre as duas proteínas permanece(m) por determinar. Além de interagir diretamente com CCN3, a Cx43 aumenta a expressão da mesma, seja promovendo a sua transcrição ou tradução, ou impedindo a sua degradação. [24]

### $\beta$ -tubulina

A demonstração de que a Src fosforila resíduos Y247 e Y265 da Cx43 permitiu descobertas subsequentes de que o resíduo Y247 inibe a interação da Cx43 com a  $\beta$ -tubulina. Na placa das GJs, a inibição da interação  $\beta$ -tubulina pode ser um mecanismo envolvido no processo de desmontagem. Se esta inibição ocorrer após a formação de Cxs na rede trans-Golgi, estas podem ser reencaminhadas para degradação ou para a membrana lateral. [32]

### Proteínas 14-3-3

Evidências crescentes sugerem que as proteínas 14-3-3 regem a coordenação da síntese *de novo* das Cx43 para a membrana plasmática. Estas proteínas constituem uma família de sete isoformas que desempenham papéis importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento celular, e estão frequentemente desreguladas em estados de doença humana, incluindo o cancro. O TC da Cx43 interage com as proteínas 14-3-3 através de um motivo de ligação-14-3-3 consenso (370RASpSRPR376). Essa interação requer a fosforilação de Ser373 no TC da Cx43, um conhecido local de fosforilação de Akt (PKB), levantando a possibilidade de que a Akt promove a interação entre a Cx43 e 14-3-3 *in vivo*. Por este motivo de ligação estar ausente noutras isoformas de Cx, a proteína 14-3-3 pode ter funções específicas de Cx43. Os papéis precisos das proteínas 14-3-3 na regulação da Cx43 não são claros, mas podem estar envolvidos na mediação da saída da Cx43 do Retículo Endoplasmático, facilitando a reticulação dos monómeros da Cx43 dentro de um HC, ou promovendo o tráfego da Cx43 a partir da rede trans-Golgi para a membrana plasmática. [24, 32]

### Proto-oncogene proteína-tirosina cinase Src (c-Src)

Como descrito anteriormente, a c-Src interage com a Cx43, fosforilando-a na Tyr247 e -265, o que está associado à redução da comunicação intercelular e ao aumento da degradação da Cx43. [24]

### Hsc70

O TC da Cx43 interage diretamente com a chaperona molecular 70 de choque térmico (Hsc70). A Hsc70 é encontrada no núcleo e no citoplasma, onde regula a maturação e a função das proteínas. A Hsc70 pode colocalizar-se com a Cx43 no citoplasma e a interação destas pode estar envolvida na mediação dos efeitos da Cx43 na progressão do ciclo celular. [24]

### Bax

A Cx43 liga-se à Bax através do seu TC, incluindo quando é expressa como um fragmento independente. Mais estudos são necessários para determinar se a Bax se liga à Cx43 de forma direta ou indireta. Em células de cancro pancreático, a interação entre Cx43 e Bax parece estar envolvida na ativação da via apoptótica mitocondrial induzida pela Cx43. [24]

Evidências sugerem que a comunicação intercelular direcionada pela Cx43 é crítica para a função celular normal, pois desempenha um papel importante no desenvolvimento,

diferenciação e funcionamento adequado das glândulas mamárias de vertebrados em diferentes estádios de crescimento, da pós-puberdade à pós-gravidez, e a perda desse recurso promove transformação maligna de células epiteliais mamárias. Estudos forneceram informações interessantes, porém precoces, sugerindo que a Cx43 desempenha um papel importante na proliferação, diferenciação e migração celular no CM. [22, 26, 35, 36]

#### 4. Cx43 e CM

As moléculas de adesão célula-célula são altamente reguladas durante o desenvolvimento e diferenciação, e a sua rutura está associada a várias doenças. No cancro, as moléculas juncionais encontram-se geralmente mutadas, sub-reguladas ou deslocizadas. [37] Os CM são heterogéneos e geneticamente diversos, e a falta de reconhecimento dessa heterogeneidade molecular pode explicar os resultados conflituosos da literatura, não apenas para o gene da Cx43, mas também para outros supressores tumorais ou oncogenes. [38]

Estudos sugerem que a expressão da Cx43 é elevada durante os estádios de desenvolvimento da glândula mamária, quando as células são mais plásticas, inclusive durante a puberdade, início da gravidez e involução precoce dos ductos mamários. A expressão de Cx43 é subsequentemente sub-regulada durante a gestação média, seguida pelo aumento da fosforilação da Cx levando ao início da lactação. [39, 40]

Foi sugerido que a função da Cx43 poderia depender do subtipo tumoral ou evoluir com o estádio do tumor. Busby *et al.* (2018) investigou se o nível de mRNA da Cx43 estava diretamente ligado aos subtipos tumorais e consistente com a expressão específica de subtipos da Cx43, os CM positivos para o RE ou RP tiveram uma expressão significativamente mais elevada de mRNA em comparação com tumores negativos para esses recetores. O gene da Cx43 também é expresso em níveis mais baixos na presença do subtipo HER2-positivo, tendo níveis mais baixos de mRNA. O papel das Cxs na progressão do TNBC, o subgrupo mais agressivo do CM, ainda é controverso. A análise de dados de *microarrays* de grandes grupos de tumores primários sugeriu que os níveis de mRNA da Cx43 estão diminuídos num subconjunto de tumores durante a carcinogénese precoce (estádio 0), e que ocorre a re-expressão do gene, originando níveis mais altos de mRNA em tumores de estágio I. [38, 41, 42]

O paradigma de que as Cxs e a comunicação intercelular têm um benefício universal, restringindo o crescimento tumoral, tem sido contestado por evidências mais recentes que sugerem um papel das Cxs em facilitar a progressão tumoral e metastização do CM. [43, 44]

#### 4.1. Cx43 e progressão tumoral do CM

Enquanto a Cx43 é geralmente sub-regulada em CM primários, essa mesma Cx é sobre-regulada durante os estádios posteriores. Evidências acumuladas sugerem que durante os estádios tumorigénicos iniciais, a sub-regulação das GJs pode contribuir para o descolamento, proliferação e intravasamento de células tumorais, e que a expressão e reunião de GJ durante estádios metastáticos posteriores podem facilitar o extravasamento e a formação de tumores secundários, através da transição epitelial-mesenquimal, angiogénese e metástases em vários tipos tumorais. [2, 37]

##### 4.1.1. Sub-expressão da Cx43

Estudos funcionais e de expressão identificaram que a regulação negativa da Cx43 e a perda simultânea de comunicação intercelular nas células tumorais está associada ao aumento da heterogeneidade celular e à rutura da homeostase que caracteriza o tecido normal e saudável, podendo estar envolvida no desenvolvimento e progressão tumoral. Além disso, a perda de comunicação intercelular também pode apoiar a carcinogénese, impedindo a disseminação de estímulos inibitórios de crescimento ou pró-apoptóticos das células vizinhas por meio do efeito *bystander*, um mecanismo em que um sinal citotóxico é transferido das células-alvo para as células vizinhas. [35, 37, 40]

Jiang *et al.* (2016) concluiu que a perda da expressão de Cx43 foi associada a marcadores de mau prognóstico, a saber, o elevado tamanho tumoral, o alto estágio, alto *status* de proliferação, alto pleomorfismo, ciclo mitótico mais rápido e pobre Índice Prognóstico de Nottingham. Assim sendo, os tumores mais agressivos apresentam baixa ou nenhuma expressão de Cx43. [42]

A ativação de promotores tumorais, tais como as vias PKC, ERbB2, EGF e / ou Src, pode contribuir para a perda reversível de Cxs e comunicação intercelular no CM humano. No entanto, apesar da evidência de que a perda de comunicação intercelular mediada por Cx43 é devida a uma redução nos níveis da proteína e do seu RNA, vários estudos relacionaram a redução de comunicação intercelular a deficiências no tráfego de Cx43 para a membrana, resultando numa localização aberrante de Cx43 no citoplasma. [35]

#### 4.1.2. Sobre-expressão da Cx43

A partir da análise da expressão de mRNA da Cx43 *in silico* num estudo realizado por Teleki *et al.* (2014), a sobre-expressão de mRNA da Cx43 foi associada a uma reduzida sobrevida global e livre de recidiva no grupo de doentes RE-negativos, melhor sobrevida livre de recidiva em tumores RE-positivos e linfonodais-positivos, e ainda em tumores RE-positivos tratados endocrinamente, e também a uma sobrevida livre de metástases significativamente superior em pacientes RE-positivos submetidos a terapia hormonal e com cancro de grau 2. **[19, 30]**

Num estudo realizado por Kazan *et al.* (2019), murganhos injetados com células MDA-MB-231 (linha celular de CM agressivo) com Cx43 sobre-regulada tiveram um início do tumor primário atrasado, menor volume tumoral primário e maior sobrevida global. Estes dados coincidem com o fenótipo menos invasivo, mais epitelial, acompanhado por genes de transição mesenquimal-epitelial regulados positivamente, observados *in vitro*. **[1, 45]**

Nos estádios iniciais de malignidade, parece provável que as células cancerígenas mantenham a capacidade de comunicarem através das GJ, caso um sinal como a sobre-expressão de Cx43 for fornecido para facilitar a formação dessas GJs. Contudo, foi demonstrado que à medida que a célula cancerígena desenvolve resistência aos agentes quimioterápicos, mecanismos adicionais surgem para inibir completamente a comunicação intercelular, tendo como exemplo a deslocalização da Cx43. **[46]**

Níveis de expressão não refletem necessariamente a função da proteína, particularmente se a expressão da proteína estiver aumentada. A localização da Cx43 também pode ser informativa ao tentar determinar se a comunicação intercelular está comprometida, sendo que a localização citoplasmática da Cx43 sugere perda de GJ em CM invasivos.

Um estudo recente de Phillips *et al.* (2017) **[19]** aludiu à ideia de que a Cx43 torna-se mais citoplásmica em tumores com níveis elevados de proliferação, sugerindo um fenótipo mais invasivo. Outros estudos confirmam a observação de que a Cx43 é predominantemente citoplásmica no CM, o que provavelmente se correlaciona com a invasividade, bem como uma perda de comunicação intercelular. Ainda neste estudo, a sobre-expressão de Cx43 na membrana e no citoplasma proporcionou uma melhor sobrevida que unicamente na membrana, que foi melhor que a ausência de expressão. Isso pode sugerir que, à medida que o tumor progride, primeiro desregula a Cx43 para o citoplasma, e que perde a expressão de Cx43 na membrana antes de perdê-la completamente. **[47]**

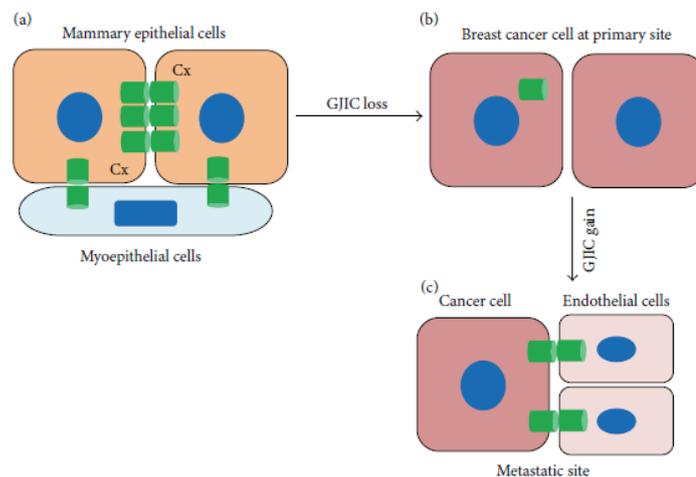
## 4.2. Cx43 e Metastização do CM

Os CM estão entre os cancros mais comuns que metastizam para o cérebro, fígado, pulmão e ossos. [48] A formação de metástases requer evasão de células cancerígenas, que estão em divisão celular descontrolada no local do tumor primário, a invasão local, intravasamento nos vasos sanguíneos e linfáticos, extravasamento em locais distantes e formação de depósitos metastáticos que se desenvolverão como lesões metastáticas. [27, 49]

A metástase depende das interações célula-célula e célula-matriz, angiogenese, da transição epitelial-mesenquimal e fatores solúveis, como o fator de crescimento endotelial vascular, secretado pelas células cancerígenas. [1] É um processo complexo que envolve não só a migração da célula tumoral, como também a interação da célula tumoral com o ambiente extracelular, deixando espaço para muitos potenciais papéis que a Cx43 e a comunicação intercelular possam desempenhar durante o processo metastático. [45]

Muitos estudos defendem que a perda de GJ contribui para permitir que as células se separem fisicamente, levando à invasão e à progressão da doença metastática. No entanto, há relatórios que indicam que a Cx43 é sobre-regulada em lesões metastáticas estabelecidas no CM, que podem ou não coincidir com a restauração da comunicação intercelular, sugerindo que as Cxs podem desempenhar papéis em etapas metastáticas tardias envolvendo o extravasamento e colonização tecidual. Além disso, durante a progressão do cancro a expressão da Cx43 mostrou mudar para os compartimentos do estroma (como por exemplo células endoteliais), sugerindo que a Cx43 pode regular a metastização do cancro através de interações entre células tumorais epiteliais e endoteliais. [19, 44, 50]

Embora alguns consensos tenham sido alcançados para o papel da Cx43 em tumores primários de CM, o seu papel exato na metastização permanece indefinido. [19]



**Figura 3:** Papel das GJs no desenvolvimento e progressão do CM. (a) Na glândula mamária normal, as células epiteliais e mioepiteliais mantêm a comunicação intercelular através das GJs. (b) Durante progressão do CM no local primário, são observados baixos níveis de Cxs e perda de comunicação intercelular. (c) À medida que o tumor progride, as células tumorais recuperam a expressão das Cxs e mantêm uma comunicação intercelular com a barreira endotelial, induzindo extravasamento e adesão ao local metastático. Adaptado de [17]

#### 4.2.1. Sobre-expressão da Cx43

Uma expressão forçada de Cx43, após transfeção de cDNA de Cx43 humano, diminuiu o crescimento deste tipo de células, diminuiu a expressão de N-caderina, que está frequentemente associada a um fenótipo agressivo, diminui o número de metástases e aumentou a sua sensibilidade à apoptose. Estes resultados sugerem que a expressão de Cx43 em células de CM diminui o seu potencial metastático através de um mecanismo independente da comunicação intercelular, estando este relacionado à expressão de N-caderina e apoptose. A N-caderina está envolvida no aumento da motilidade, invasão e metástases de células de CM e, portanto, a diminuição da expressão de N-caderina em células MDA-MB-435 com sobre-expressão de Cx43 pode contribuir para diminuição da metastização *in vivo*. [51, 52]

*In vivo*, em murganhos xenoenxertados com células de CM MDA-MB-231, a sobre-expressão de Cx43 diminuiu o volume do tumor, atenuou a metástase de células para os pulmões e fígado e aumentou a sobrevida global dos mesmos. Coletivamente, a sobre-expressão de Cx43 induziu o sequestro de  $\beta$ -catenina na membrana celular e um fenótipo epitelial, suprimindo o crescimento tumoral e metástases para órgãos secundários *in vivo*. Um estudo reportou o domínio de um fenótipo epitelial após a sobre-expressão de Cx43, que promoveu a expressão dos marcadores epiteliais E-caderina e ZO-1. [1, 49]

#### 4.2.2. Knockdown da Cx43

Em contraste, o *knockdown* de Cx43 em células MDA-MB-231 induziu um fenótipo mesenquimal com aumento da invasão celular, levando a um fenótipo metastático aumentado. Isto levou à investigação da expressão do marcador transição epitelial-mesenquimal. De facto, a sub-regulação da Cx43 resultou na expressão do marcador mesenquimal N-caderina. Assim sendo, a troca de E-caderina para N-caderina em Cx43-*knocking-down* confirma as observações morfológicas e estabelece o papel de Cx43 na transição epitelial-mesenquimal de células MDA-MB-231. O aumento desta transição e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como a N-caderina, estão então correlacionados com o aumento da invasividade celular. Além disso, o *knockdown* de Cx43 também foi associado à ativação da via de sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina, que é conhecida por ter um papel central na biologia do cancro. Efetivamente, o bloqueio da sinalização Wnt /  $\beta$  suprime a metastização do CM. [1, 49]

Assim, a manutenção da atividade da Cx43 nas GJs, preservando a comunicação intercelular, poderá ter o potencial de atenuar a transformação maligna, progressão tumoral e metastização do CM, fornecendo uma importante distinção entre células epiteliais mamárias normais e malignas. [19, 44, 53]

Embora o papel da Cx43 no início do cancro e nos estádios posteriores da tumorigénese nem sempre seja claro, estudos direcionados para avaliar os estádios exatos do processo metastático no sentido de aprofundar a compreensão do papel da Cx43 na progressão do CM são necessários, sendo importante reconhecer que o CM é causado por processos biológicos complexos envolvendo mutações em múltiplos genes e que estas observações contraditórias provavelmente representam diferenças nas abordagens experimentais, na heterogeneidade celular dos tumores, nos papéis sobrepostos de outros membros da família de Cxs cuja expressão pode variar dependendo do modelo experimental, e da complexidade do processo metastático. [49, 54-56]

Idealmente, a avaliação dos subtipos individuais do CM (por exemplo, RE-positivo, HER2-positivo e triplo-negativo) é necessária para obter uma visão clara do papel da Cx43 na progressão do CM, uma vez que este varia consoante o subtipo. Podemos obter conhecimento adicional à medida que se forem identificando as funções de GJ e HCs heterotípicos, bem como funções da Cx43 não relacionadas com GJ. [41]

O restauro da rede de GJ entre células tumorais tem o potencial de suprimir a migração, invasão e metástase de células de CM e possivelmente outras células tumorigênicas, inspirando assim interesse significativo nas GJs como novos alvos terapêuticos. [50, 54, 55]

## **5. Estratégias terapêuticas**

Devido à expressão diferencial e funções das Cxs em vários estádios da carcinogênese mamária, várias estratégias terapêuticas foram desenvolvidas para modular a expressão de Cxs ou das GJs, a fim de exercer efeitos anti-tumorais relevantes. Como discutido anteriormente, foi demonstrado que a sobre- ou re-expressão de Cxs, restaurando a rede de GJ, exerce atividades anti-tumorais em células mamárias cancerígenas [22], suprimindo ainda a migração, invasão e metástase dessas células e possivelmente outras, inspirando significativo interesse em utilizar GJ como novos alvos terapêuticos. [50]

Infelizmente, o desenvolvimento e avaliação de intervenções terapêuticas que visam a Cx43 em CM é complicado devido à evidência de que as Cxs podem ter papéis diferenciais e dinâmicos durante a disseminação de células tumorais. [35, 44]

### **5.1. Abordagens terapêuticas que exploram a função Cx43**

Foram realizadas tentativas para alterar a função das Cx, com o intuito de inibir o crescimento tumoral. As abordagens terapêuticas incluem péptidos miméticos da Cx43, inibidores da Cx43, agentes químicos capazes de melhorar a função da Cx43 e nano-transportadores revestidos com antigénios direcionados para a Cx43.

Esforços para modular terapêuticamente a Cx43 centram-se em torno de fármacos que através da alteração da dinâmica membranar, têm como alvo indireto a Cx43, ou pela inibição direta da atividade da GJ da Cx43. Como nas fases iniciais do desenvolvimento do CM é preferível restaurar em vez de inibir a comunicação intercelular da Cx43, são necessários agentes que restaurem esta forma de comunicação celular. [19]

Desde a descoberta precoce do ácido 18- $\alpha$ -glicirretínico, um inibidor reversível da comunicação intercelular, os avanços tecnológicos trouxeram várias terapêuticas adicionais, como por exemplo, moduladores epigenéticos, anticorpos, peptídeos, RNA antissenso, miRNAs e CRISPR-Cas9 para inibir as funções de comunicação intercelular das Cxs. [21]

### **5.1.1. Potenciais estratégias terapêuticas e a sub-expressão da Cx43**

Durante os estádios tumorigênicos iniciais, a sub-regulação das GJs pode contribuir para o descolamento, proliferação e intravasamento de células tumorais. As células cancerígenas dependem de GJ para trocar iões, metabolitos, solutos e mensageiros secundários, que são necessários para a sobrevivência celular. O bloqueio dessas GJs impede a comunicação intercelular e, conseqüentemente, a transferência de compostos essenciais às células, levando à apoptose celular.

#### **5.1.1.1. Carbenoxolona**

A cabenoxolona é um dos derivados do ácido glicirretínico mais conhecidos e, até há alguns anos atrás, foi o bloqueador da comunicação intercelular mais utilizado, apesar de não se conhecer o mecanismo de ação exato.

Num estudo, a adição do inibidor de GJ da Cx43 levou os autores a descobrirem que a terapia combinada com etopósido induziu apoptose através da interrupção da interação célula-célula, aumentando a morte celular de glioma e sobrevivência dos murganhos tratados em 27%. [18, 53] Assim, podíamos transpor este estudo para linhas celulares de CM, de forma a obter pistas para um possível fármaco para o tratamento do CM.

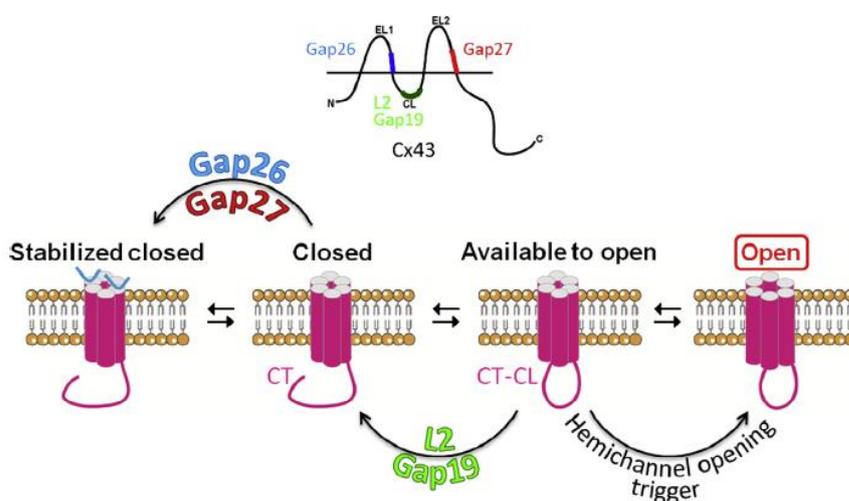
#### **5.1.1.2. Gap26, Gap27, Gap19 e L2**

O frequentemente usado undecapeptídeo Gap27 possui homologia de sequência com uma sequência na AE2 de diferentes subtipos de Cx, incluindo Cx43, Cx37 e Cx40. Simultaneamente, foi desenhado outro peptídeo, chamado Gap26, com uma sequência homóloga para a AE1 de Cx43 e outras Cxs.

A principal hipótese sobre o seu modo de ação baseia-se atualmente na interferência desses peptídeos com o encaixe HC-HC, por impedimento estérico. Além disso, foi também sugerido que eles poderiam também interromper as interações HC-HC existentes, embora essa hipótese pareça menos provável, já que a formação de GJ resulta numa ligação muito apertada. Os peptídeos conseguem também interferir com a comunicação intercelular ou induzir mudanças conformacionais, que podem estar associadas à diminuição da montagem de HCs ou ao acoplamento de HCs num canal juncional. [18, 57, 58]

Após estímulo elétrico ou químico, para ocorrer a abertura do HC, tem que ser estabelecida uma ligação entre o domínio TC e AC da Cx. Os peptídeos L2, composto por 26 aminoácidos, e Gap19, composto por 9 aminoácidos, são idênticos a uma sequência

localizada na AC da Cx43. Estes ligam-se ao domínio TC da Cx43, impedindo assim a interação TC-AC. Posto isto, os peptídeos Gap19 e L2 mantêm os HCs num estado fechado, impedindo a sua abertura e subsequente a comunicação intercelular. As porções intracelulares da Cx43 com as quais estes compostos interagem são muito diferentes entre os diferentes isotipos, tornando os efeitos noutras Cxs menos prováveis, apesar de não poderem ser excluídos. Além disso, a semi-vida e a estabilidade destes peptídeos miméticos devem ser determinadas e aumentadas, de forma a avaliar a dose e o período de tempo em que estes serão eficazes. [18]



**Figura 4:** Inibidores peptídicos e o seu efeito no estado dos HCs. Inibição da interação TC-AC pelos peptídeos L2 e Gap19, e o impedimento estérico do undeca-peptídeo Gap26 e Gap27 no encaixe HC-HC. Adaptado de [18]

### 5.1.1.3. 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina - TCDD

A 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), um composto organoclorado, é um poluente ambiental altamente persistente e conhecido como carcinogénico humano, que demonstrou alterar a diferenciação da glândula mamária e aumentar a suscetibilidade ao CM num modelo de CM em murganhos, tendo um possível papel potencial na regulação da comunicação intercelular. No entanto, o efeito do TCDD na comunicação intercelular em linhagens de células da mama humanas não foi estabelecido.

Foi demonstrado que em células MCF-7 a TCDD diminui a atividade da proteína Cx43 e das GJs, e conseqüentemente a comunicação intercelular, através da fosforilação da Cx43 por meio da via de sinalização PKC $\alpha$ , e que em células epiteliais mamárias humanas leva à mudança nas placas de Cx43 em direção à membrana perinuclear, afetando a localização da Cx43. Isto tem a consequência de diminuir a comunicação intercelular. [22, 59]

No entanto, dada a toxicidade e potencial carcinogénico deste composto, a sua utilização terapêutica na modulação da atividade da Cx43 não é exequível, sendo necessário identificar compostos menos tóxicos e não carcinogénicos para que esta abordagem possa ser útil no tratamento do CM.

#### **5.1.1.4. Envolvimento do RE na expressão da Cx43**

Evidências demonstraram que a expressão, modificação, estabilidade e localização de Cxs podem ser alvos de recetores de hormonas nucleares por mecanismos transcricionais e não transcricionais. Numerosos estudos celulares e *in vivo* têm mostrado que ambos os subtipos de RE (RE $\alpha$  e RE $\beta$ ) são reguladores críticos da comunicação intercelular nos órgãos reprodutores. O significado biológico da regulação estrogénica de GJ está ligado aos profundos papéis destas hormonas esteroides na proliferação, desenvolvimento e diferenciação do tecido mamário. [2]

##### **5.1.1.4.1. 17 $\beta$ -estradiol**

Foi relatado que o 17 $\beta$ -estradiol aumenta a comunicação intercelular via Cx através da via RE $\alpha$  /  $\beta$ -catenina. [2]

##### **5.1.1.4.2. Fulvestrant**

O Fulvestrant, um antagonista seletivo dos RE, exerce a sua função principalmente através da indução da degradação dos RE. [2, 60]

O grupo de Yeh *et al.* (2018), de modo a correlacionar a expressão de RE e Cx43, observou que o fulvestrant reduziu a expressão de Cx43 em linhas celulares de CM RE-positivas, mas não em linhas triplamente negativas. Além disso, demonstrou que o fulvestrant diminuiu a expressão das proteínas de ambos os subtipos de RE e Cx43 de uma maneira dependente da dose em várias linhas celulares de CM.

Estudos recentes mostraram que a ubiquitinação está envolvida na degradação da Cx43 mediada pela ligase proto-oncogénica E3 Nedd4, levando à internalização e degradação da Cx43. O antagonismo dos RE pelo fulvestrant aumentou a ligação da ligase E3 Nedd4 à Cx43, levando ao aumento da sua ubiquitinação, resultando conseqüentemente na redução dos seus níveis celulares. [2]

#### **5.1.1.4.3. Tamoxifeno**

O tamoxifeno, um agonista parcial dos RE, surgiu como o primeiro agente anti-estrogénico clinicamente aplicável ao CM. No entanto, a resistência ao tamoxifeno tornou-se uma grande preocupação para o tratamento do CM.

Pensa-se que os efeitos antitumorais do tamoxifeno são devidos à sua actividade anti-estrogénica, mediada pela inibição competitiva da ligação do estrogénio aos RE, com subsequente ativação da apoptose. A inibição da expressão de genes regulados por estrogénios provoca uma diminuição no crescimento e proliferação celular.

O grupo de Yeh *et al.* (2018) conduziu um estudo em que foi concluído que o tamoxifeno leva a uma sub-expressão de Cx43, e que esta é regulada de uma maneira dose- e tempo-dependente do 4-OH-tamoxifeno. Demonstrou ainda que o tamoxifeno induziu a internalização e degradação da Cx43 pelo sistema ubiquitina-proteassoma mediada por Nedd4. Estes resultados permitem concluir que o tamoxifeno leva à diminuição da comunicação intercelular e, posteriormente, da proliferação celular. [2, 44]

#### **5.1.1.4.4. Anastrozol e letrozol**

A inibição da síntese de estradiol pelo anastrozol e pelo letrozol diminuiu de um modo dependente da dose a expressão de Cx43 em duas linhas celulares RE-positivas. [2]

Em conjunto, estes resultados demonstraram que a inibição da sinalização de RE, por ablação de estrogénio ou antagonismo do seu recetor, resultou na diminuição da expressão de Cx43, sugerindo que os estrogénios e seus recetores estão envolvidos na regulação da expressão de Cx43 em células de CM RE-positivas. [2]

#### **5.1.1.5. MicroRNAs (miRNA)**

Os miRNAs são um dos maiores grupos de fatores reguladores pós-transcricionais, cujas 2–8 bases no terminal 5' podem ligar-se à região 3' não traduzida do mRNA alvo, induzindo a sua degradação e impedindo a tradução, com a consequente redução da síntese proteica. Uma variedade de miRNAs desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular, angiogénese, invasão e metastização do CM. [61, 62]

##### **5.1.1.5.1. miR-206**

O primeiro miRNA descoberto associado ao CM foi o miR-206. Uma redução significativa dos níveis de miR-206 ocorre nos tecidos de CM, estando estes intimamente

associados com um estágio clínico avançado e menor sobrevida global. Os pacientes com sobre-expressão de miR-206 têm um atraso notável no desenvolvimento de metástases e uma sobrevida livre mais longa das mesmas em comparação com aqueles com sub-expressão de miR-206.

A expressão do miR-206 é reduzida no CM humano RE-positivo, e a transfecção do miR-206 para células MDA-MB-231 de CM humano pode inibir o seu crescimento. Foi reconhecido que, como fator de regulação pós-transcricional, o miR-206 pode regular a progressão e metastização do CM, apesar do seu gene alvo ainda não ser conhecido. [62, 63]

Num estudo conduzido por Lin *et al.* (2016), foram transfectados para linhas celulares de cancro da mama lentivírus para silenciar e para sobre-expressar miR-206, tendo-se observado que a diminuição da expressão de miR-206 se correlacionava com o aumento do mRNA e proteína da Cx43, assim como com a proliferação, migração e capacidade de invasão das células, enquanto que o aumento da sua expressão teve os efeitos opostos. [62]

Em resumo, a sobre-regulação do miR-206 suprime a proliferação de células de CM e a sua metastização, bloqueando a expressão de Cx43. Estes dados experimentais podem fornecer uma estratégia para direcionar a interação miR-206 / Cx43 numa nova aplicação terapêutica para tratar doentes com CM.

#### **5.1.1.5.2. miR-1 e miR-200a**

Outros miRNAs têm sido associados à expressão de Cx43 e à regulação do CM, nomeadamente miR-1, miR-200a, miR-381, miR-23a/b e miR-186 que foram identificados como novos supressores da Cx43 em células de CM. [22] Além disso, foram observados níveis notavelmente diminuídos de miR-1 e miR-200a, bem como o aumento da expressão de mRNA de Cx43, em metástases de CM metastático, em comparação com os tecidos primários de cancro. Estas descobertas indicaram que o eixo miR-1/Cx43 ou miR-200a/Cx43 podem ser alvos promissores para o diagnóstico e terapêutica do CM metastático. [61]

#### **5.1.2. Potenciais estratégias terapêuticas e a sobre-expressão da Cx43**

A expressão e reunião de GJ durante estádios metastáticos posteriores podem facilitar o extravasamento e a formação de tumores secundários. A partir do efeito *bystander*, o aumento no número ou tamanho de GJ resultam numa maior difusão de agentes citotóxicos, sensibilização a quimioterápicos e amplificação da resposta terapêutica dos mesmos.

### 5.1.2.1. Péptido mimético da Cx43 - $\alpha$ CTI

$\alpha$ CTI, um fármaco peptídico único com 25 aminoácidos que imita o domínio de ligação da Cx43 ao domínio PDZ2 da ZO-1, interferindo na interação destes e assim redirecionando os HCs de Cx43 desacoplados para as placas de GJ, aumentando o seu tamanho, sem afetar os níveis de proteína Cx43. [18, 22, 44]

Num estudo conduzido por Grek *et al.* (2015), os resultados mostram que a modulação da sinalização de Cx43 com  $\alpha$ CTI aumenta efetivamente a comunicação intercelular em células de CM, aumentando a citotoxicidade induzida pelo tamoxifeno na linha celular MCF-7 e do lapatinib na linha BT474. Estes resultados demonstram que a modulação da atividade das GJs e a distribuição intercelular do  $\alpha$ CTI através do efeito *bystander* prejudicam a proliferação ou a sobrevivência das células do CM, destacando o  $\alpha$ CTI como um potencial agente terapêutico no tratamento do CM. [44]

Curiosamente, o  $\alpha$ CTI é o primeiro peptídeo mimético de Cx a entrar em estudos clínicos de Fase III, mas no contexto do tratamento da úlcera do pé diabético. [18]

### 5.1.2.2. Cisplatina

Estudos recentes sugeriram que a toxicidade da cisplatina pode ser também mediada pela comunicação intercelular funcional.

Evidências demonstram que a redução da expressão da Cx43 parece estar associada ao aumento da resistência à cisplatina, tendo este facto gerado interesse na possibilidade de se utilizar um intensificador de comunicação intercelular para aumentar a eficácia da cisplatina, já tendo alguns resultados pré-clínicos promissores. [64]

Num estudo de Arora *et al.* (2018) foi demonstrado que o tratamento com cisplatina poderia levar a citotoxicidade em células vizinhas, não tratadas, através de GJ. Nas experiências em que há bloqueio da comunicação intercelular ou das GJs, farmacologicamente ou por sub-regulação da transcrição de Cx43, respetivamente, demonstrou-se que o efeito *bystander* é dependente do nível de comunicação intercelular, exibindo-se este efeito mesmo em baixos níveis da mesma. A Cx43 fosforilada pela Src ativada diminuiu a comunicação intercelular e aumentou a sobrevivência na presença de cisplatina. O aumento farmacológico da expressão de comunicação intercelular ou Cx43 seria um alvo ideal para aumentar a eficácia da cisplatina em doentes, aumentando o efeito *bystander*, aumentando assim o impacto clínico do tratamento com cisplatina.

Estes dados sugerem que a funcionalidade de comunicação intercelular poderia ser útil como uma nova estratégia para influenciar, positivamente, a quimioterapia com cisplatina e outros agentes. [64]

### **5.1.2.3. Quinolonas substituídas**

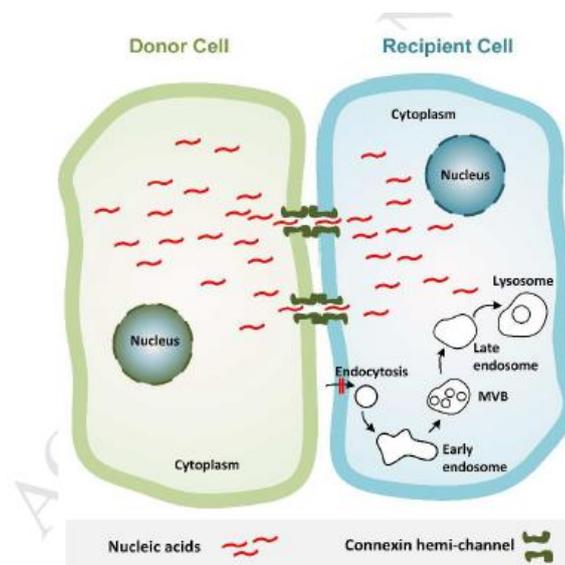
Foi testada a eficácia de quinolonas substituídas, como a PQI [6-methoxy-8-[(3-aminopropyl)amino]-4-methyl-5-(3-trifluoromethylphenoxy)quinoline], conhecidas por serem ativadoras de GJ, em combinação com o tamoxifeno, numa linha celular de CM. O tratamento combinado mostrou uma diminuição significativa na viabilidade celular em comparação com o tratamento com tamoxifeno sozinho, com um aumento significativo na expressão de BAX, ativação de caspase 3 e fragmentação de DNA, sugerindo que o tratamento combinado com tamoxifeno e o ativador de GJ poderá aumentar ainda mais o efeito apoptótico em células de CM humano. [65]

### **5.1.2.4. Transporte de ácidos nucleicos através de GJ usando células que expressam Cx43 e exossomas Cx43-positivos**

A Cx43 facilita a administração citoplasmática direta de fármacos e ácidos nucleicos, contornando completamente o ambiente degradativo das vias endocíticas. Assim, a biodisponibilidade do fármaco no local de ação pode ser significativamente aumentada e as doses do mesmo podem ser diminuídas se a Cx43 for explorada como um alvo terapêutico.

Uma área emergente de entrega de fármacos é através do uso de células inteiras como veículos de entrega. As células exploram as GJs para a transferência direta de moléculas para o citoplasma das células vizinhas, através de HCs, sendo esta uma abordagem de entrega altamente atraente para pequenos RNAs ou outras cargas de ácidos nucleicos. No entanto, os mecanismos exatos de como a Cx43 realiza esta transferência não são totalmente compreendidos. Foi proposto que os locais de ligação ao RNA da Cx poderiam ser responsáveis pelo recrutamento de moléculas de RNA para os HCs, facilitando a internalização dos mesmos através das Gjs. Contudo, este processo precisa de ser melhor investigado. [53, 66]

Da mesma forma que as células usam Cx43 para a transferência de material genético, foi demonstrado que os exossomas positivos para Cx43 utilizam o mesmo mecanismo. Para tumores com sobre-regulação de Cx43, a administração de exossomas ou outras nanopartículas equipadas com GJ e carregados com fármacos citotóxicos ou macromoléculas terapêuticas, poderia explorar esta sobre-expressão da Cx43 nas Gjs. [53]



**Figura 5:** Modelo para a entrega citoplasmática direta de ácidos nucleicos através de HCs. A carga de ácidos nucleicos da célula doadora é capaz de ser transportada para o citoplasma de células adjacentes sem ser sujeita ao ambiente degradativo da via endossomal e lisossomal. Adaptado de[53]

#### 5.1.2.5. Depleção do pseudogene da Cx43 ( $\Psi$ Cx43) usando um siRNA

Uma adição recente à lista de abordagens visando a síntese de Cx no estágio pós-transcricional é a modulação dos níveis de Cx43 pela supressão da expressão do pseudogene da Cx43 ( $\Psi$ Cx43). As células de CM humano expressam o  $\Psi$ Cx43 e este prejudica a síntese normal da Cx43, já que o mRNA do  $\Psi$ Cx43 e da Cx43 competem pela maquinaria de tradução celular. Uma vez que o  $\Psi$ Cx43 consegue ligar-se mais eficientemente a essa maquinaria do que Cx43, isto resulta em níveis reduzidos de mRNA de Cx43.

Assim, a depleção do  $\Psi$ Cx43 usando uma abordagem de siRNA causa sobre-expressão da Cx43 em células de CM, resultando numa maior sensibilidade destas à exposição aos fármacos quimioterápicos, como por exemplo ao paclitaxel e doxorrubicina. [22, 31]

#### 5.1.2.6. Ácido *all-trans* retinóico

Vários fármacos, como o ácido *all-trans* retinóico, um derivado da vitamina A, e carotenóides, são conhecidos pela indução da expressão de Cx43, melhorando a comunicação intercelular, que conseqüentemente leva a um aumento do efeito *bystander* e, assim, ao aumento da eficiência da morte celular e apoptose do CM. No entanto, apesar de ser uma possível estratégia terapêutica custo-efetiva, a eficácia deste tipo de terapia para o tratamento do cancro é limitada devido à baixa atividade de morte celular. [22, 40, 53]

## **5.2. Desafios clínicos na terapêutica de Cx**

Dado que a fisiologia humana saudável requer um nível adequado de GJ funcionais em todos os momentos, e que este nível varia durante o envelhecimento saudável e durante as mudanças fisiológicas adaptativas, quaisquer estratégias terapêuticas para regular os níveis funcionais de Cx precisam de ser consideradas cuidadosamente.

A contemplação do potencial valor terapêutico dos fármacos direcionados para a Cx43 deve ter em consideração se as descobertas em modelos pré-clínicos em roedores se estendem aos seres humanos. Outro grande obstáculo é o direcionamento e a entrega de fármacos ao local de ação. [1]

Em relação à aplicação clínica de agentes peptídicos miméticos da Cx43, esta é um pouco limitada devido à sua instabilidade e baixa disponibilidade oral. [19] Além disso, uma importante questão está ligada aos possíveis efeitos indesejáveis dos mesmos. Uma vez que são bastante curtos, tendo apenas alguns aminoácidos e estando mais de 50% destes carregados positivamente, a possibilidade dos mesmos exercerem interações eletrostáticas inesperadas com outros alvos é bastante plausível. Além disso, a semi-vida e a estabilidade destes peptídeos miméticos devem ser determinadas e aumentadas para avaliar a dose e o período de tempo em que serão eficazes. [18]

## **5.3. Potenciais estratégias futuras**

É possível imaginar e desenhar fármacos que irão induzir a expressão do gene codificador da Cx43 nos casos em que há expressão deficiente da mesma. Na era da tecnologia CRISPR – Cas9, também é possível considerar a edição de genes para reparar mutações do gene da Cx de tal forma que as conduzem para a superfície celular onde podem manter a função das GJs. [18]

Além de abordagens terapêuticas com pequenas moléculas para regular a comunicação intercelular ou regular a estabilidade global de GJs, a utilização de anticorpos bloqueadores da Cx43 podem reduzir o crescimento tumoral isoladamente, ou em combinação com terapia anticarcinogénica padrão.

Embora as estratégias de direcionamento de anticorpos anti-Cx estejam no início do desenvolvimento como possíveis terapêuticas, começam a surgir evidências de que os anticorpos anti-Cx43 e comunicação intercelular possam ter valor terapêutico no cancro e outras doenças. [1, 21]

## 6. Considerações Finais

As Cxs são biomarcadores de diagnóstico confiáveis para o comportamento do CM, e múltiplos estudos revelaram que, em pacientes com CM, a expressão de proteínas Cx está correlacionada com outros biomarcadores clínico-patológicos, incluindo os RE, RP e HER2, que são normalmente usados para prever a resposta à terapêutica de doentes com CM.

Por outro lado, o potencial das Cxs, e em particular da Cx43, como alvos terapêuticos para o CM é cada vez mais alvo de estudo. Os novos desenvolvimentos terapêuticos, a fim de aumentar ou diminuir a expressão da Cx43 ou da comunicação intercelular para reverter as características tumorais celulares, dão-nos esperança para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos para o tratamento de tumores específicos, como o CM, tendo como alvo a Cx43. Dada a complexidade das funções e interações das Cxs, e da Cx43 mais especificamente, os tratamentos que as têm como alvo, estabilizando-as, e / ou a outras proteínas que interagem com esta, devem ser considerados em combinação com outras estratégias terapêuticas para produzirem maiores benefícios, particularmente à luz do seu possível papel em facilitar o efeito *bystander*, onde o aumento no número ou tamanho de GJ, e aumento de comunicação intercelular resultam numa maior difusão de agentes citotóxicos, sensibilização a quimioterápicos e amplificação da resposta terapêutica. [28]

No entanto, na atualidade a hipótese de que a Cx43 possa ser usada como alvo terapêutico final está longe de ser convincente. Várias questões no que diz respeito à sua utilização, especificidade e estabilidade devem ser abordadas no futuro e mais estudos são necessários para investigar as funções dos HCs na carcinogénese e na progressão tumoral, com uma caracterização mais funcional, independente ou dependente de GJ, e a investigação de possíveis interações cruzadas com outras vias de sinalização na oncogénese mamária seriam úteis para elucidar completamente o potencial terapêutico desta Cx no CM. [22] Além disso, será também necessário ter em conta o tipo, o estágio e as propriedades do tumor, sendo pouco provável que a Cx43 como único alvo seja suficiente para o desenvolvimento de novas terapêuticas do CM.

Futuros esforços exigirão abordagens multidirecionais e personalizadas, nas quais a natureza do defeito da Cx43 seja bem compreendida, com o intuito de elucidar aspetos fundamentais como o papel da Cx43 nas células estaminais cancerígenas, funções não-juncionais e para conhecer por completo o seu papel fisiológico, como por exemplo no sistema imunológico ou no estroma tumoral. Embora nenhum fármaco Cx-específico tenha recebido aprovação, a importância da Cx43 na fisiologia e na doença humana, em conjunto com o seu

interesse comercial, indica que o desenvolvimento destas terapias está a progredir, mas ainda está longe de poderem ser utilizadas eficazmente no tratamento do CM.

## 7. Referências Bibliográficas

- [1] Kazan, J., El-Saghir, J., Saliba, J., Shaito, A., Jaleddine, N., El-Hajjar, L., Al-Ghadban, S., Yehia, L., Zibara, K., El-Sabban, M. - **Cx43 Expression Correlates with Breast Cancer Metastasis in MDA-MB-231 Cells In Vitro, In a Mouse Xenograft Model and in Human Breast Cancer Tissues.** *Cancers*, 11(4) (2019), 460.
- [2] Tsai, C.-F., Cheng, Y.-K., Lu, D.-Y., Wang, S.-L., Chang, C.-N., Chang, P.-C., Yeh, W.-L. - **Inhibition of estrogen receptor reduces connexin 43 expression in breast cancers.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 338 (2018), 182–190.
- [3] Mahshid, G., Zahra, P., Hamid, S. - **Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World**, 17 (2016), 43-46.
- [4] GLOBOCAN 2018 – **Global cancer data.** [Acedido a 26 de junho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>
- [5] Goldman, L., Schafer, A. I. - **Goldman-Cecil Medicine: Breast cancer and benign breast disorders.** 25ª Ed. Saunders-. Elsevier, 2015. ISBN 978-1-4557-5017-7.
- [6] Nunes, A.T., Berman, T., Harris, L. - **Principles & Practice of Oncology: Molecular Biology of Breast Cancer.** 11ª Ed. Philadelphia: Absolute Service, Inc. 2019. ISBN 9781496394651.
- [7] Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P., Zhu, H.-P. - **Risk Factors and Preventions of Breast Cancer.** *International Journal of Biological Sciences*, 13(11) (2017), 1387–1397.
- [8] Hayes, D. F., Lippman, M. E. - **Harrison's Principles of Internal Medicine: Breast cancer.** 20ª Ed. Porto Alegre: AMGH, 2018. ISBN 9781259644047.
- [9] Anastasiadi, Z., Lianos, G.D., Ignatiadou, E., Harissis, H.V., Mitsis, M. - **Breast cancer in young women: an overview.** *Updates in Surgery*, 69(3) (2017), 313–317.
- [10] Akinyemiju, T.F., Demb, J., Izano, M.A., Rehkopf, D.H., Fang, M.-L., Hiatt, R.A., Braithwaite, D. - **The association of early life socioeconomic position on breast cancer incidence and mortality: a systematic review.** *International Journal of Public Health*, (2017).
- [11] Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S. - **Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer.** *Breast Disease*, 32(1-2) (2011), 35–48.

- [12] Bonilla, B.J.A, Tabanera, T.M., Mendoza, R.L.H. - **El cáncer de mama en el siglo xxi: de la detección precoz a los nuevos tratamientos.** *Radiology*, 59 (5) (2017), 368-379.
- [13] Lehmann, B.D., Jovanovic, B., Chen, X. - **Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection.** *PloS One* 11(6) (2016).
- [14] Nowikiewicz, T., Chmielowska, E., Andruszewicz, H., Łysik-Miśkurka, J., Głowacka, I., Sowa, M., Zegarski, W. - **Prevalence of biological types of breast cancer and their influence on disease staging and therapeutic management – a single-center study.** *Polish Journal of Pathology*, 1 (2017), 16–25.
- [15] Laird, D.W., Lampe, P.D. - **Therapeutic strategies targeting connexins.** *Nature Reviews Drug Discovery*. (2018).
- [16] Falk, M.M., Bell, C.L., Kells Andrews, R.M., Murray, S.A. - **Molecular mechanisms regulating formation, trafficking and processing of annular gap junctions.** *BMC Cell Biology*, 17(S1) (2016).
- [17] Banerjee, D. - **Connexin's Connection in Breast Cancer Growth and Progression.** *International Journal of Cell Biology*, (2016), 1–11.
- [18] Delvaeye, T., Vandenabeele, P., Bultynck, G., Leybaert, L., Krysko, D.V. - **Therapeutic Targeting of Connexin Channels: New Views and Challenges.** *Trends in Molecular Medicine*. (2018).
- [19] Phillips, S.L., Williams, C.B., Zambrano, J.N., Williams, C.J., Yeh, E.S. - **Connexin 43 in the development and progression of breast cancer: What's the connection? (Review).** *International Journal of Oncology*, 51(4) (2017), 1005–1013.
- [20] Meşe, G., Richard, G., White, T. W. - **Gap Junctions: Basic Structure and Function.** *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11) (2007), 2516–2524.
- [21] Aasen, T., Mesnil, M., Naus, C.C., Lampe, P.D., Laird, D.W. - **Gap junctions and cancer: communicating for 50 years.** *Nature Reviews Cancer*, 16(12) (2016), 775–788.
- [22] Banerjee, D. - **Connexin's Connection in Breast Cancer Growth and Progression.** *International Journal of Cell Biology*, (2016), 1–11.
- [23] Leithe, E., Mesnil, M., Aasen, T. - **The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(1) (2018), 48–64.

- [24] Kanaporis, G., Brink, P. R., Valiunas, V. - **Gap junction permeability: selectivity for anionic and cationic probes.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(3) (2011), C600–C609.
- [25] Soares, A. R., Martins-Marques, T., Ribeiro-Rodrigues, T., Ferreira, J. V., Catarino, S., Pinho, M. J., Zuzarte, M., Isabel A.S., Manadas, B., Sluijter, J., Girao, P., H. - **Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells.** *Scientific Reports*, 5(1) (2015).
- [26] Zhou, J.Z., Jiang, J.X. - **Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions - An update.** *FEBS Lett.* 588 (2014), 1186–1192.
- [27] Gava, F., Rigal, L., Mondesert, O., Pesce, E., Ducommun, B., Lobjois, V. - **Gap junctions contribute to anchorage-independent clustering of breast cancer cells.** *BMC Cancer*, 18(1) (2018).
- [28] El-Saghir, J.A., El-Habre, E.T., El-Sabban, M.E., Talhouk, R.S. - **Connexins: a junctional crossroad to breast cancer.** *The International Journal of Developmental Biology*, 55(7-8-9) (2011), 773–780.
- [29] Solan, J.L., Lampe, P.D. - **Spatio-temporal regulation of connexin43 phosphorylation and gap junction dynamics.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(1) (2018), 83–90.
- [30] Teleki, A.M., Szasz, M.E., Maros, B., Gyorffy, J., Kulka, N., Meggyeshazi N., Kiszner, G., Balla, P., Samu, A., Krenacs, T. - **Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis.** (11) (2014).
- [31] Klotz, L.-O. - **Posttranscriptional regulation of connexin-43 expression.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 524(1) (2012), 23–29.
- [32] Spagnol, G., Trease, A., Zheng, L., Gutierrez, M., Basu, I., Sarmiento, C., Sorgen, P. - **Connexin43 Carboxyl-Terminal Domain Directly Interacts with  $\beta$ -Catenin.** *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6) (2018), 1562.
- [33] Herve, J., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D., Duffy, H. - **Gap junctional complexes: From partners to functions.** *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 94(1-2) (2007), 29–65.

- [34] Sanchez-Tillo, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., Postigo, A. -  **$\beta$ -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(48) (2011), 19204–19209.
- [35] Grek, C.L., Rhett, J.M., Bruce, J.S., Ghatnekar, G.S., Yeh, E.S. - **Connexin 43, breast cancer tumor suppressor: Missed connections?** Cancer Letters, 374(1) (2016), 117–126.
- [36] Ferrati, S., Gadok, A.K., Brunaugh, A.D., Zhao, C., Heersema, L.A., Smyth, H.D.C., Stachowiak, J.C. - **Connexin membrane materials as potent inhibitors of breast cancer cell migration.** J. R. Soc. Interface (2017), 14.
- [37] Talhouk, R.S., Fares, M.-B., Rahme, G.J., Hariri, H.H., Rayess, T., Dbouk, H. A., El-Sabban, M.E. - **Context dependent reversion of tumor phenotype by connexin-43 expression in MDA-MB231 cells and MCF-7 cells: Role of  $\beta$ -catenin/connexin43 association.** Experimental Cell Research, 319(20) (2013), 3065–3080.
- [38] Busby, M., Hallett, M., Plante, I. - **The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer.** International Journal of Molecular Sciences, 19(3) (2018), 693.
- [39] El-Saghir, J.A., El-Habre, E.T., El-Sabban, M.E., Talhouk, R.S. - **Connexins: a junctional crossroad to breast cancer.** The International Journal of Developmental Biology, 55(7-8-9) (2011), 773–780.
- [40] KONG, H., LIU, X., YANG, L., QI, K., ZHANG, H., ZHANG, J., Huang, Z., WANG, H. - **All-trans retinoic acid enhances bystander effect of suicide gene therapy in the treatment of breast cancer.** Oncology Reports, 35(3) (2015), 1868–1874.
- [41] Phillips, S.L., Williams, C.B., Zambrano, J.N., Williams, C.J., Yeh, E.S. - **Connexin 43 in the development and progression of breast cancer: What's the connection? (Review).** International Journal of Oncology, 51(4) (2017), 1005–1013.
- [42] Jiang, G., Dong, S., Yu, M., Han, X., Zheng, C., Zhu, X., Tong, X. - **Influence of gap junction intercellular communication composed of connexin 43 on the antineoplastic effect of adriamycin in breast cancer cells.** Oncology Letters, 13(2) (2016), 857–866.
- [43] Naus, C.C., Laird, D.W. - **Implications and challenges of connexin connections to cancer.** Nature Reviews Cancer, 10(6) (2010), 435–441.

- [44] Grek C.L., Rhett J.M., Bruce J.S., Abt M.A., Ghatnekar G.S., Yeh E.S. - **Targeting connexin 43 with alpha-connexin carboxyl-terminal (ACT1) peptide enhances the activity of the targeted inhibitors, tamoxifen and lapatinib, in breast cancer: clinical implication for ACT1.** BMC Cancer, 15 (2015), 296.
- [45] Chao, Y., Wu, Q., Acquafondata, M., Dhir, R., Wells, A. - **Partial Mesenchymal to Epithelial Reverting Transition in Breast and Prostate Cancer Metastases.** Cancer Microenvironment, 5(1) (2011), 19–28.
- [46] Yeh, E.S., Williams C.J., Williamns C.B., Bonilla I.V., Klauber-deMore N., Phillips S.L. - **Dysregulated connexin 43 in HER2-positive drug resistant breast cancer cells enhances proliferation and migration.** 65 (2017), Vol. 8.
- [47] Conklin, C., Huntsman, D., Yorida, E., Makretsov, N., Turbin, D., Bechberger, J.F., Naus, C.C. - **Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer.** Cancer Letters, 255(2) (2007), 284–294.
- [48] Stoletov, K., Strnadel, J., Zardouzian, E., Momiyama, M., Park, F.D., Kelber, J.A, Pizzo, D.P., Hoffman R., VandenBerg, S.R., Klemke, R.L. - **Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization.** J. Cell Sci., 126 (2013) 904-913.
- [49] Chasampalioti, M., Green, A.R., Ellis, I.O., Rakha, E.A., Jackson, A.M., Spendlove, I., Ramage, J.M. - **Connexin 43 is an independent predictor of patient outcome in breast cancer patients.** Breast Cancer Research and Treatment. (2018).
- [50] Ferrati, S., Gadok, A.K., Brunaugh, A.D., Zhao, C., Heersema, L.A., Smyth, H.D.C., Stachowiak, J.C. - **Connexin membrane materials as potent inhibitors of breast cancer cell migration.** Journal of The Royal Society Interface, 14(133) (2017), 20170313.
- [51] Li, Z., Zhou, Z., Welch, D. R., & Donahue, H. J. - **Expressing connexin 43 in breast cancer cells reduces their metastasis to lungs.** Clinical & Experimental Metastasis, 25(8) (2008), 893–901.
- [52] Kotini, M., Barriga, E.H., Leslie, J., Gentzel, M., Rauschenberger, V., Schambony, A., Mayor, R. - **Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo.** Nature Communications, 9(1) (2018).
- [53] Bonacquisti, E., Nguyen, J. - **Connexin 43 (Cx43) in Cancer: Implications for Therapeutic Approaches via Gap Junctions.** Cancer Letters. (2018).

- [54] Ferrati, S., Gadok, A.K., Brunaugh, A.D., Zhao, C., Heersema, L.A., Smyth, H.D.C., Stachowiak, J.C. - **Connexin membrane materials as potent inhibitors of breast cancer cell migration.** *J. R. Soc. Interface* (2017), 14.
- [55] Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S. - **Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer.** *Breast Disease*, 32(1-2) (2011), 35–48.
- [56] Gava, F., Rigal, L., Mondesert, O., Pesce, E., Ducommun, B., Lobjois, V. - **Gap junctions contribute to anchorage-independent clustering of breast cancer cells.** *BMC Cancer*, 18 (2018), 221.
- [57] Desplantez, T., Verma, V., Leybaert, L., Evans, W. H., Weingart, R. - **Gap26, a connexin mimetic peptide, inhibits currents carried by connexin43 hemichannels and gap junction channels.** *Pharmacological Research*, 65(5) (2012), 546–552.
- [58] Faniku, C., O’Shaughnessy, E., Lorraine, C., Johnstone, S. R., Graham, A., Greenhough, S., Martin, P. - **The Connexin Mimetic Peptide Gap27 and Cx43-Knockdown Reveal Differential Roles for Connexin43 in Wound Closure Events in Skin Model Systems.** *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2) (2018), 604.
- [59] Gakhar, G., Schrempp, D., Nguyen, T.A. - **Regulation of gap junctional intercellular communication by TCDD in HMEC and MCF-7 breast cancer cells.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235(2) (2009), 171–181.
- [60] Lee, C. I., Goodwin, A., Wilcken, N. - **Fulvestrant for hormone-sensitive metastatic breast cancer.** *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (2017).
- [61] Ming, J., Zhou, Y., Du, J., Fan, S., Pan, B., Wang, Y., Jiang, J. - **Identification of miR-200a as a novel suppressor of connexin 43 in breast cancer cells.** *Bioscience Reports*, 35(5) (2015), e00251–e00251.
- [62] Lin, Z.-J., Ming, J., Yang, L., Du, J.-Z., Wang, N., Luo, H.-J. - **Mechanism of Regulatory Effect of MicroRNA-206 on Connexin 43 in Distant Metastasis of Breast Cancer.** *Chinese Medical Journal*, 129(4) (2016), 424–434.
- [63] Fu, Y., Shao, Z.M., He, Q.Z., Jiang, B.Q., Wu, Y., Zhuang, Z.G. - **Hsa-miR-206 represses the proliferation and invasion of breast cancer cells by targeting Cx43.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(11) (2015), 2091-104.

**[64]** Arora, S., Heyza, J., Chalfin, E., Ruch, R., Patrick, S. - **Gap Junction Intercellular Communication Positively Regulates Cisplatin Toxicity by Inducing DNA Damage through Bystander Signaling.** *Cancers*, 10(10) (2018), 368.

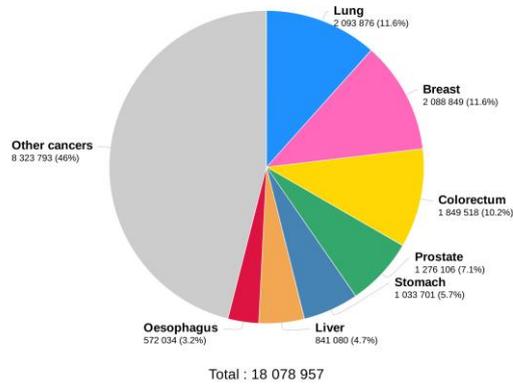
**[65]** Gakhar, G., Hua, D.H., Nguyen, T.A. - **Combinational treatment of gap junctional activator and tamoxifen in breast cancer cells.** *Anti-Cancer Drugs*, 21(1) (2010), 77–88.

**[66]** Varela-Eirin, M., Varela-Vazquez, A., Rodríguez-Candela Mateos, M., Vila-Sanjurjo, A., Fonseca, E., Mascareñas, J. L., Eugenio, M., Mayan, M.D. - **Recruitment of RNA molecules by connexin RNA-binding motifs: Implication in RNA and DNA transport through microvesicles and exosomes.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(4) (2017), 728–736.

## Anexos

### Anexo 1: Incidência do CM a nível mundial, de entre todos os cancros, tendo em conta o género e idade

Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers, both sexes, all ages

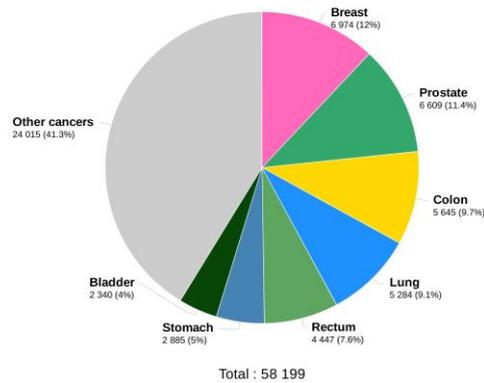


Data source: Globocan 2018  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization

### Anexo 2: Incidência do CM em PT tendo em conta o género e idade

Estimated number of new cases in 2018, Portugal, all cancers, both sexes, all ages

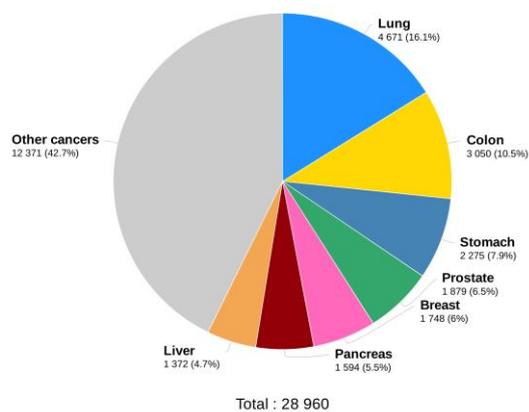


Data source: Globocan 2018  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization

### Anexo 3: Mortalidade de todos os cancros, tendo em conta o género e idade

Estimated number of deaths in 2018, Portugal, all cancers, both sexes, all ages



Data source: Globocan 2018  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization