

Maria Virgolino e Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Oxysterols and their effects: The good, the bad and the not so ugly” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Helena Amado, do Doutor António Lucas Nunes e da Professora Doutora Maria Manuel da Cruz Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Maria Virgolino e Silva**

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Oxysterols and their effects: The good, the bad and the not so ugly” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Helena Amado, do Doutor António Lucas Nunes e da Professora Doutora Maria Manuel da Cruz Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Declaração de Honra

Eu, Maria Virgolino e Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011111526, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágios e Monografia intitulada “Oxysterols and their effects: the good, the bad and the not so ugly” 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 destes Relatórios de Estágios e Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 4 de setembro de 2017.

Maria Virgolino e Silva

(Maria Virgolino e Silva)

## **Agradecimentos**

Os meus mais sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram e fizeram parte da minha vida académica:

Aos meus pais e irmãos.

Ao Olivier.

À Sofia.

À Professora Maria Manuel Silva, que me acompanhou durante os 6 anos de vida académica.

Mais que uma professora, uma amiga.

À D. Graça, que sempre com um sorriso, se mostrou prestável em me auxiliar.

A toda a equipa da Farmácia Luciano & Matos.

Ao grupo de investigação da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

Finalmente, ao pessoal docente e não docente da faculdade de farmácia que contribuíram para a minha aprendizagem não só científica como também pessoal.

## Índice

### Parte A - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

<b>Abreviaturas</b> .....	8
<b>1. Introdução</b> .....	9
1.1. Grupo Holon .....	9
1.2. Metodologia KAIZEN .....	10
1.3. Preparação Individualizada da Medicação .....	11
1.4. Programa de Troca de Seringas.....	11
1.5. Manipulados.....	12
1.5.1. Cápsulas .....	13
1.5.2. Pomada.....	14
1.6. Oportunidades de formação .....	15
1.7. Estágio aos Sábados .....	16
<b>2. Análise SWOT</b> .....	17
2.1. <i>Strenghts</i> (Forças) .....	17
2.2. <i>Weaknesses</i> (Fraquezas).....	17
2.3. <i>Opportunities</i> (Oportunidades) .....	17
2.4. <i>Threats</i> (Ameaças).....	18
<b>3. Considerações finais</b> .....	18
3.1. Considerações do estágio.....	18
3.2. Considerações do curso .....	19
<b>Bibliografia</b> .....	20
<b>Anexos</b> .....	21
Anexo 1 – Documentação relativa à manipulação das cápsulas.....	21
Anexo 2 – Documentação relativa à manipulação da pomada.....	24
<b>Parte B - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica</b>	
<b>Lista de figuras</b> .....	29
<b>Lista de tabelas</b> .....	29

<b>Abreviaturas</b> .....	30
<b>1. Introdução</b> .....	31
<b>2. Contextualização</b> .....	31
2.1. Terapia Fotodinâmica.....	31
2.2. Redaporfin .....	32
2.3. Ciclodextrinas.....	33
2.3.1. Características gerais, vantagens e desvantagens .....	33
2.3.2. Métodos de produção de complexos de inclusão.....	34
2.3.3. Métodos de caracterização dos complexos de inclusão.....	35
2.3.4. Ciclodextrinas para administração Intravenosa aprovadas pela FDA.....	36
<b>3. Trabalho laboratorial</b> .....	37
3.1. Escolha da CD .....	37
3.2. Escolha do método.....	37
3.3. Escolha dos solventes a utilizar nos diferentes métodos.....	38
3.4. Resultados.....	38
3.4.1. <i>Paste complexation</i> .....	38
3.4.2. Co-precipitação.....	39
3.4.3. Evaporação de solvente.....	40
3.5. Considerações finais.....	41
<b>4. Análise SWOT</b> .....	42
4.1. <i>Strenghts</i> (Forças) .....	42
4.2. <i>Weaknesses</i> (Fraquezas).....	43
4.3. <i>Opportunities</i> (Oportunidades) .....	43
4.4. <i>Threats</i> (Ameaças) .....	43
<b>5. Considerações finais acerca do estágio</b> .....	44
<b>Bibliografia</b> .....	45
<b>Anexos</b> .....	47
Anexo I – Dados dos químicos utilizados .....	47

Anexo II – Dados dos equipamentos utilizados.....	47
Anexo III – Tabela resumo de moléculas da literatura e do redaporfin .....	48

## **Parte C - Monografia**

<b>List of figures</b> .....	50
<b>Abbreviations</b> .....	51
<b>Abstract</b> .....	53
<b>Resumo</b> .....	54
<b>1. Introductory notes: oxysterols, synthesis and effects</b> .....	55
<b>2. Cytotoxicity of oxysterols</b> .....	57
2.1. Vascular wall.....	58
2.2. Tumoral Cells .....	62
<b>3. Breast cancer</b> .....	63
3.1. Oxysterols as promoters of cancer .....	64
3.2. Oxysterols as anticancer compounds .....	65
<b>4. Liver-X-Receptor</b> .....	67
4.1. Liver-X-Receptor and Nuclear Receptor family .....	67
4.2. Retinoid-X-Receptor contribution to Liver-X-Receptor activity .....	69
4.3. Liver-X-Receptor: properties and heterodimer formation.....	69
4.4. Liver-X-Receptor and lipid homeostasis .....	70
4.5. Liver-X-Receptor and anti-inflammatory activity .....	71
4.6. Liver-X-Receptor and cancer .....	72
<b>5. Final considerations</b> .....	74
<b>Bibliography</b> .....	76

Parte A - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Luciano & Matos



## **Abreviaturas**

ANF: Associação Nacional de Farmácias

BPF: Boas Práticas de Farmácia

DCI: Denominação Comum Internacional

LCB: Licenciatura em Ciências Bioanalíticas

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

OMS: Organização Mundial de Saúde

PIM: Preparação Individualizada da Medicação

PTS: Programa de Troca de Seringas

P.V.P: Preço de Venda ao Público

RM: Receita Médica

SGQ: Sistema de Gestão da Qualidade

SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SWOT: *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana

## **I. Introdução**

Farmácia histórica em Coimbra, com primeiro alvará datado de 1929, a Farmácia Luciano & Matos é uma farmácia que se destaca positivamente não só em termos de serviços como no próprio funcionamento e organização da farmácia.

A farmácia encontra-se situada numa zona em que o número de farmácias é elevado, e por isso, esta prima por um atendimento mais personalizado de modo a destacar a farmácia em relação às suas concorrentes.

Em 2009, a farmácia integra o grupo de farmácias Holon, uma marca de farmácias que são independentes e autónomas entre si, mas que partilham igual metodologia, produtos e serviços com o objetivo de melhorar a qualidade de vida da população envolvente.

Dotada de iniciativa, também é pioneira na adaptação do seu Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) à metodologia *KAIZEN*, que se caracteriza por uma metodologia japonesa que tem por objetivo diminuir o desperdício.

Esta farmácia, sita na Praça 8 de Maio, tem diferentes públicos-alvo, onde se destacam essencialmente a população mais idosa e a população toxicodependente. Tendo em conta estas populações, a farmácia tem serviços adaptados às mesmas, destacando-se serviço de Preparação Individualizada da Medicação (PIM) e o programa de prevenção da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Programa de troca de seringas), implementado antes de qualquer benefício por parte do estado.

Para além dos serviços comuns que competem às farmácias, esta também possui um serviço já não tão comum e frequente, a preparação de medicamentos manipulados, sendo uma atividade diária e de grande procura.

Ao longo do relatório serão abordados os pontos enunciados acima, bem como a análise SWOT do meu estágio e as considerações finais acerca do estágio e do curso.

### **I.1. Grupo Holon**

Em 2008, em período de crise, surgiu o grupo Holon com o objetivo de valorizar a atividade farmacêutica tendo em conta o período crítico que estava a afetar o país.

O grupo Holon tem por objetivo consolidar a farmácia como um meio de promoção de saúde, de primeira escolha das populações, oferecendo um atendimento cuidado e personalizado com inúmeros serviços associados. Desses serviços destacam-se os serviços

comuns a todas as farmácias como a determinação de glicémia, colesterol total, triglicéridos, tensão arterial, mas também consultas de podologia, nutrição, pé diabético, dermocosmética, PIM e consulta farmacêutica (HOLON, 2010a).

O grupo Holon não prima apenas pela personalização em termos de serviços, como também oferece uma vasta quantidade de produtos de marca própria como: suplementos alimentares, produtos de higiene oral, produtos de cuidados da pele, produtos “Bebé e mamã”, produtos de primeiros socorros, entre outros (HOLON, 2010b).

## **1.2. Metodologia KAIZEN**

A metodologia *KAIZEN* que se caracteriza por uma filosofia que defende a melhoria contínua de todos os processos (GEMBAKAIZEN, 2017), foi implementada na farmácia Luciano & Matos após a perceção de alguns processos poderiam sofrer melhorias. Um desses exemplos foi a implementação do robot na farmácia após o surgimento das receitas eletrónicas. Estas receitas, uma vez que podem não possuir um suporte físico, como o guia de tratamento, dificultavam o aviamento das receitas, dado que era necessário regressar várias vezes ao balcão de modo a verificar quais os medicamentos que o utente necessitava. Uma vez que os colaboradores se tinham de deslocar frequentemente ao *BackOffice*, a atenção dada aos utentes era menor e o tempo de atendimento era superior, o que levava a enchentes na farmácia. O robot conseguiu colmatar isso, uma vez que o tempo de *picking* dos produtos é menor, favorecendo um atendimento mais personalizado, mais satisfatório e mais curto.

Hoje em dia, a metodologia *KAIZEN* está implementada conjuntamente com o SGQ, sendo que a farmácia Luciano & Matos foi uma das farmácias que participou num projeto-piloto. Este projeto tinha por objetivo evidenciar como as farmácias podiam ajustar o seu SGQ a esta metodologia e a farmácia demonstrou resultados muito positivos.

Durante o decorrer do estágio, a farmácia foi alvo de auditorias não só para a avaliação do SGQ, como também para aferir a elegibilidade da farmácia para a participação num concurso promovido pelo *KAIZEN*. Há que notar que os estagiários foram inseridos nas atividades da farmácia, competindo-lhes a elaboração de imagens sombra, de etiquetas amovíveis para a identificação de prateleiras no armazém e a elaboração de etiquetas para as gavetas que se encontram expostas na sala de atendimento de modo a normalizar a apresentação.

Geralmente, três vezes por semana, faz-se um balanço onde se avalia como está a decorrer a campanha mensal, quais os pontos de melhoria, sugestões de melhoria e outros assuntos. Os

estagiários são sempre integrados nestas pequenas reuniões de modo a estarem a par do funcionamento da farmácia.

### **1.3. Preparação Individualizada da Medicação**

A polimedicação está em crescimento na população portuguesa, tendo em conta que cada vez mais as pessoas são afetadas por doenças que derivam dos hábitos pessoais, como diabetes, colesterol, hipertensão, entre outras, para além que o aparecimento dos medicamentos genéricos dificulta a perceção acerca do que estão a tomar, verificando-se muitas vezes a duplicação de medicação. Estes fatores dificultam a toma correta dos medicamentos principalmente numa população mais envelhecida em que muitas vezes a iliteracia está presente, contribuindo assim para uma não adesão à terapêutica.

A PIM tem por objetivo promover a toma correta dos medicamentos, separando semanalmente a medicação, por dias da semana e por períodos de toma (Pequeno-almoço, almoço, jantar e ao deitar), após uma conversa com o utente onde se percebe quais as dificuldades, o porquê de não efetuar as tomas corretamente e se o utente sabe qual o objetivo da toma de certo medicamento.

Apesar de não ter participado ativamente no processo, observei a Dra. Andreia Rocha na preparação dos PIM e quando estava ao balcão, quando solicitado, entregava a medicação semanal ao utente.

### **1.4. Programa de Troca de Seringas**

De acordo com a OMS, o número de novos casos por VIH na europa, no ano de 2015, foi de 153 mil (WHO, 2017)<sup>1</sup>. O uso de drogas injetáveis recreativamente está longe da erradicação devido ao consumo crescente e ao policonsumo de drogas como álcool e drogas lícitas e ilícitas. Uma vez que este é um horizonte dificilmente atingível, o Programa de Troca de Seringas (PTS) é uma das armas para o combate às infeções por doenças contagiosas como Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)/SIDA e Hepatite.

O PTS foi instituído pelo governo português em 1993 que resultou numa cooperação entre a Associação Nacional de Farmácias (ANF) e Comissão Nacional de Luta contra a SIDA, integrado no Programa Nacional para a infeção VIH/SIDA (DGS, 2013). Em 2012, apesar dos benefícios do programa para a comunidade, este foi interrompido devido à incapacidade da ANF em suportar os custos associados ao programa em vigor (DGS, 2013).

---

<sup>1</sup> Consultado a 25 de maio de 2017

Tendo-se reconhecido o valor do programa no combate de doenças causadas por drogas recreativas injetáveis, no início de 2015 o programa foi de novo instituído, sendo que as farmácias passaram a ser remuneradas pela troca de Kits de seringas.

O kit (Figura 1) é composto por duas seringas, um preservativo, dois toalhetes desinfetantes, duas caricas, um filtro, duas saquetas de ácido cítrico e uma ampola de água destilada.

A cedência do kit está condicionada pela entrega das seringas anteriormente adquiridas, sendo que, por exemplo, se o utente entregar duas seringas, terá direito receber um kit.



Figura 1 - Imagem ilustrativa do Kit do PTS.

Ainda antes de qualquer apoio do estado neste tipo de programas, a farmácia já efetuava este tipo de serviços, uma vez que o local onde a farmácia se situa tem uma comunidade toxicodependente ativa.

A farmácia Luciano & Matos é procurada diariamente para este tipo de serviços, sendo uma farmácia onde os toxicodependentes se sentem acolhidos, sendo essa a razão principal para o sucesso do programa nesta farmácia.

### 1.5. Medicamentos manipulados

A arte de manipular medicamentos, que já remonta a muitos séculos atrás, é uma prática descontinuada na maioria das farmácias, devido ao facto de neste momento a indústria ter capacidade de resposta para a maior parte dos medicamentos procurados (GLINTT, 2017). No entanto, continua-se a verificar que muitas vezes os médicos aconselham medicamentos inexistentes no mercado quer em termos de princípios ativos quer em termos de forma farmacêutica, sendo por isso necessária a manipulação.

A farmácia Luciano & Matos possui um laboratório de manipulação de acordo com as Boas Práticas de Fabrico (BPF), sob a responsabilidade da Dra. Mélanie Duarte e da Dra. Carmen Monteiro, que executam a manipulação de medicamentos para todo o país, tendo em conta a escassez de farmácias que oferecem este serviço.

A manipulação executada vai desde as formas farmacêuticas mais convencionais, como comprimidos e cápsulas, até xaropes, cremes, pomadas e óvulos vaginais.

Este serviço não é solicitado apenas para uso humano, mas também para uso animal, existindo clínicas veterinárias que solicitam a manipulação de medicamentos para animais que possuem, por exemplo, doenças oncológicas.

No final do estágio foi possível a realização de manipulados, como cápsulas e uma pomada propriamente dita, sempre sob a supervisão da Dra. Mélanie Duarte. A manipulação não se baseou apenas na preparação do medicamento manipulado, como também no preenchimento da ficha de manipulação que incluía o cálculo do preço total em matérias primas, os dados do controlo de qualidade da forma farmacêutica final, o custo de manipulação e o custo com o material de embalagem. Tendo em conta estes fatores, é possível calcular o preço final do medicamento manipulado e elaborar a etiqueta final para identificar o produto manipulado.

O cálculo do preço final do manipulado inclui três parâmetros: Valor referente às matérias primas (A), valor referente à manipulação (B) e valor referente ao material de embalagem (C) (Portaria N.º 769/ 2004 de 1 de Julho).

$$(A + B + C) \times 1,3 + IVA (6\%) = P.V.P. \text{ (Preço de Venda ao Público)}$$

A rotulagem também é essencial uma vez que é no rótulo que se veicula a informação ao utente. De acordo com a Portaria n.º 594/2004 de 2 de junho, um rótulo deve conter: os dados da farmácia, número de lote, data de preparação, P.V.P., nome do utente, nome do médico prescriptor, composição quantitativa, posologia, quantidade, prazo de utilização, mencionar qual a via de administração, conselhos de conservação como “Conservar à temperatura ambiente, no frasco bem fechado e ao abrigo da luz”, advertências como “Manter fora do alcance das crianças” e informações adicionais como por exemplo “Contém lactose”.

### **1.5.1. Cápsulas**

As cápsulas foram preparadas de acordo com uma cópia de uma receita médica (RM) magistral onde indicava a quantidade de cada componente necessária à preparação de uma cápsula e o número de cápsulas solicitadas para o tratamento. Neste caso, como era uma cópia de uma RM não foi possível fazer a comparticipação da mesma (30 %) (Despacho N.º 18694/2010). A cópia apenas é um comprovativo de que o médico prescreveu ao utente aquele preparado magistral e quais as quantidades a usar no mesmo.

A preparação das cápsulas é bastante simples, seguindo os passos de:

1. Verificar o estado de limpeza do material;
2. Pesar as matérias primas (se necessário homogeneizar para que não haja segregação dos pós dentro da cápsula);
3. Misturar num almofariz de vidro, através do método de adição geométrica;
4. Colocar as cápsulas na máquina de enchimento de cápsulas manual;
5. Preencher as cápsulas, na totalidade, com a mistura de pós (se necessário compactar o pó das cápsulas);
6. Retirar as cápsulas do equipamento e limpá-las suavemente de modo a remover algum pó que possa ter ficado à superfície;
7. Efetuar os ensaios de controlo de qualidade;
8. Lavar e secar o material usado.

Os ensaios de controlo de qualidade são breves permitindo avaliar a cor, o odor, o aspeto, ensaio de uniformidade de massa e o número de cápsulas preparadas (Anexo I).

No caso da rotulagem das cápsulas, o rótulo contém os dados da farmácia, número de lote, data de preparação, P.V.P., nome do utente, nome do médico prescritor, composição quantitativa, posologia, quantidade, prazo de utilização, mencionar “Medicamento para administração oral”, conselhos de conservação como “Conservar à temperatura ambiente, no frasco bem fechado e ao abrigo da luz”, advertências como “Manter fora do alcance das crianças” e informações adicionais como por exemplo “Contém lactose”.

Em anexo (Anexo I), encontra-se a ficha de preparação relativa às cápsulas.

### **1.5.2. Pomada**

A pomada foi preparada também através da cópia de uma RM, neste caso uma pomada de Propionato de Clobetasol e ácido salicílico (5%) (INFARMED I. P., 2008). Tendo em conta que o Propionato de Clobetasol existe no mercado com o nome de Dermovate<sup>®</sup>, desacondiçionou-se o princípio ativo das bisnagas comerciais.

A preparação da pomada seguiu os seguintes passos:

1. Verificar o estado de limpeza do material;
2. Desacondiçionar as 2 bisnagas de Dermovate<sup>®</sup> pomada e colocar diretamente no recipiente unguator;
3. Pesar o ácido salicílico e adicionar ao recipiente;

4. Adicionar a vaselina sólida diretamente no recipiente de modo a perfazer a massa final de 100 g;
5. Executar a mistura no recipiente;
6. Fechar o recipiente e rotular;
7. Efetuar os ensaios de controlo de qualidade;
8. Lavar e secar o material usado.

Os ensaios de controlo de qualidade avaliam as características como cor, odor, aspeto e a quantidade que se vai dispensar.

No caso das pomadas, o rótulo para além de conter as informações gerais como os dados da farmácia, número de lote, data de preparação, P.V.P., nome do utente, nome do médico prescriptor, composição quantitativa, posologia, quantidade, prazo de utilização, via de administração “Medicamento para aplicação cutânea”, conselhos de conservação como “Conservar à temperatura ambiente, no frasco bem fechado e ao abrigo da luz”, advertências como “Manter fora do alcance das crianças”, contém a advertência “Uso externo” a fundo vermelho.

Em semelhança às cápsulas, encontra-se em anexo a ficha de preparação relativa ao manipulado prescrito (Anexo 2).

### **1.6. Oportunidades de formação**

Ao longo do estágio, foi dada a oportunidade de participação em quatro formações de modo a enriquecer o conhecimento em produtos que a farmácia possui prestando um aconselhamento mais cuidado aos clientes.

A primeira formação, fazia parte de um ciclo de formações promovido pela GSK denominada de “Gestão de categoria – como potenciar a categoria de higiene oral na farmácia”, que decorreu no Hotel Vila Galé em Coimbra, no dia 2 de março de 2017.

Esta formação incidiu não só no modo de gestão do marketing, como a exposição e a organização dos lineares, nomeadamente os lineares relacionados com a saúde oral, como também incidiu na apresentação da marca Parodontax®. Tendo em conta que é uma marca que tem sido bastante publicitada nos meios de comunicação social, a formação mostrou-se bastante útil, uma vez que forneceu informações acerca de como aconselhar melhor o cliente na aquisição dos produtos e para além disso divulgou características peculiares do dentífrico: o sabor salgado, não fazer espuma e possuir a cor salmão.



A segunda formação, realizada na farmácia pela academia OmegaPharma, teve como objetivo apresentar a pílula EllaOne<sup>®</sup>, usada como contraceção de emergência. A colaboradora da OmegaPharma incidiu em parâmetros farmacológicos como o mecanismo de ação, efeitos secundários e contraindicações, mas também em parâmetros de dispensa tais como a quem se destina, como tomar e precauções a ter.

A terceira formação foi promovida pela NordPharma, no Hotel Trip em Coimbra, no dia 30 de março de 2017 e teve como objetivo divulgar os produtos Bioactivo Selénio + Zinco<sup>®</sup>, Bioactivo Q10<sup>®</sup> e Bioactivo Glucosamina Duplo<sup>®</sup>. Esta formação teve bastante utilidade, principalmente relativamente ao produto Bioactivo Glucosamina Duplo<sup>®</sup>, uma vez que a população sénior que recorre à farmácia se queixa de bastantes problemas articulares, adquirindo na farmácia bastantes analgésicos e anti-inflamatórios para esses problemas, mas não recorrem a suplementos alimentares para poder tratar a origem do problema.

A farmácia, pertencendo ao grupo Holon, possui um produto denominado de Holon Artro<sup>®</sup> que é equiparável a este produto da Bioactivo, carecendo apenas da Vitamina C que auxilia na fixação da glucosamina nas articulações. Assim sendo, esta formação auxiliou não só no aconselhamento do produto da NordPharma, como também no aconselhamento do Holon Artro<sup>®</sup> que é uma alternativa mais económica, mas de igual qualidade para a regeneração das articulações.

Finalmente, a última formação decorreu no Hotel Vila Galé em Coimbra, no dia 12 de abril de 2017 e teve como objetivo a formação dos profissionais de saúde acerca dos dispositivos inalatórios que se encontram no mercado. Esta formação revelou-se bastante importante, pois apesar da classe farmacêutica não ser quem prescreve, é quem intervém na utilização dos dispositivos. É bastante frequente verificar que os doentes não sabem como utilizar os dispositivos e muitas vezes quando afirmam que sabem utilizar, verifica-se que não é verdade. Assim sendo, esta formação teve bastante importância pois permitiu esclarecer algumas dúvidas acerca dos dispositivos inalatórios mais incomuns como o Respimat<sup>®</sup>, por exemplo, permitindo assim uma intervenção mais correta.

### **1.7. Estágio aos Sábados**

Durante o estágio, foi solicitada a frequência durante alguns Sábados, a partir do momento em que se possuía autonomia para realizar o atendimento.

A frequência do estágio aos Sábados, apesar de ser um pouco cansativo, revelou-se bastante positiva dado que permitiu o contacto com utentes diferentes dos semanais. Geralmente, os

utentes de sábado são indivíduos mais jovens que recorrem à farmácia por necessidade de um aconselhamento mais especializado de modo a resolver problemas sem necessitarem de ir ao médico. Como a farmácia está situada numa zona de bastante turismo e é a única farmácia que está aberta na baixa durante a tarde de Sábado, é bastante comum o atendimento de turistas que vêm comprar desde um simples analgésico até a um protetor solar.

## **2. Análise SWOT**

A análise SWOT apresentada diz respeito aos *Strengths* (Forças), *Weaknesses* (Fraquezas), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças) que caracterizam o meu estágio no contexto de farmácia comunitária.

### **2.1. Strengths (Forças)**

Como forças no desempenho do meu estágio, destaco:

- Simpatia;
- Capacidade de comunicação;
- Rápida adaptação à equipa;
- Gosto em colaborar.

### **2.2. Weaknesses (Fraquezas)**

Relativamente às fraquezas destaco:

- Timidez nos primeiros contactos com os utentes;
- Receio em falhar quer para o utente quer para os restantes colegas da equipa;
- Dificuldade em associar a Denominação Comum Internacional (DCI) ao nome do medicamento original;
- Dificuldade em relacionar casos práticos complexos com a matéria teórica aprendida.

### **2.3. Opportunities (Oportunidades)**

Como oportunidades no estágio destaco:

- Comunicação com diversas faixas etárias e com diferentes grupos sociais, como os toxicodependentes;
- Preparação de medicamentos manipulados;

- Trabalhar em contexto de SGQ associado à metodologia KAIZEN;
- Aquisição de formação adicional.

## **2.4. Threats (Ameaças)**

Os fatores que considero como ameaças são:

- Os utentes que já vêm à farmácia com uma ideia formada dificultando assim o aconselhamento mais correto;
- Os utentes que não lidam bem com a presença dos estagiários no atendimento.

## **3. Considerações finais**

### **3.1. Considerações do estágio**

O estágio na farmácia Luciano & Matos pode descrever-se como uma experiência bastante enriquecedora, não só a nível profissional como pessoal.

O desenvolvimento a nível profissional foi possível uma vez que a equipa sempre se demonstrou prestável em auxiliar e em ensinar, o que facilitou o primeiro impacto com esta nova realidade, desde a receção de encomendas, faturação, gabinete do utente, atendimento até à elaboração dos manipulados.

Em termos de enriquecimento pessoal, o contato com diferentes pessoas promoveu a compreensão de outras realidades um tanto esquecidas como o caso do abandono do idoso. A farmácia acaba por ter um papel importante no dia-a-dia deste grupo social, pois é onde muitas vezes acabam por desabafar acerca da sua vida e das suas necessidades. Um simples sorriso acaba por melhorar o dia da pessoa que está do outro lado do balcão.

Os utentes também têm um papel importante no nosso estágio, pois a maioria tem sempre um comentário positivo e reagem bastante bem à presença dos estagiários, o que faz com que fique um sentimento de reconhecimento e alguma nostalgia do término do estágio.

No geral, o estágio foi uma experiência bastante enriquecedora permitindo a aplicação dos conhecimentos apreendidos durante os 5 anos de curso, bem como a aquisição de novos conhecimentos.

### **3.2. Considerações do curso**

O meu percurso académico não é o percurso comum, uma vez que primeiro licenciiei-me em Ciências Bioanalíticas (LCB) e só depois transitei para o 3º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). A razão pela qual fiz esta opção deveu-se à falta de conhecimentos que possuía acerca do medicamento, uma vez que a minha formação em LCB apenas me forneceu conhecimentos gerais sobre o medicamento e como proceder ao controlo de qualidade do mesmo. Por esta razão, resolvi ingressar no MICF pois assim completaria os meus conhecimentos acerca do ciclo do medicamento.

O MICF é um curso que fornece conhecimentos acerca de todas as áreas farmacêuticas, o que é ótimo pois o leque de oportunidades de emprego é mais vasto. No entanto, apesar do meu percurso menos comum, considero que com o passar dos anos académicos comecei a identificar-me com algumas vertentes, como por exemplo com a vertente de indústria.

Assim sendo, na minha opinião, penso que ao longo dos anos curriculares se devia de ter a oportunidade de escolher disciplinas de opção, pois assim teria a oportunidade de optar por disciplinas com as quais me identifico mais.

## Bibliografia

DGS - **Relatório anual do Programa diz não a uma seringa em segunda mão** (2013).

GEMBAKAIZEN - **Kaizen institute** [Em linha] [Consult. 2 maio. 2017]. Disponível em <https://pt.kaizen.com/training/kaizen-college.html>

GLINTT - SIFARMA 2000<sup>®</sup>. 2017.

HOLON, G. - **Serviços Holon** [Em linha] [Consult. 2 maio. 2017]. a]. Disponível em <http://www.grupo-holon.pt/pt/public/servicos>

HOLON, G. - **Produtos Holon** [Em linha] [Consult. 2 maio. 2017]. b]. Disponível <http://www.grupo-holon.pt/pt/public/produtos>

INFARMED, I. P. - **Farmacopeia Portuguesa 9**. 9<sup>a</sup> Ed. Lisboa, 2008.

**Portaria N.º 769 / 2004 , de 1 de Julho** - [Em linha] [Consult. 25 maio. 2017]. Disponível em [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria\\_769-2004.pdf/a0b1c512-ac77-42d4-9b06-8b1f3da9fb4d](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_769-2004.pdf/a0b1c512-ac77-42d4-9b06-8b1f3da9fb4d)

**Portaria nº594/2004, de 2 de junho** - [Em linha] [Consult. 25 maio. 2017]. Disponível em [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria\\_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a)

**Despacho N.º 18694/2010** - [Em linha] [Consult. 25 maio. 2017]. Disponível em <http://www.sg.min-saude.pt/NR/ronlyres/B9EBB192-952E-4C97-94FD-6B54A9F75A58/25217/6102861029.pdf>

WHO - **HIV/AIDS** [Em linha] [Consult. 25 maio. 2017]. Disponível em <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/hiv/aids/hiv/aids>

## Anexos

## Anexo I – Documentação relativa à manipulação das cápsulas



Ficha de manipulação de cápsulas

UTENTE: XXXXXXXXXX LOTE: CP-14317  
 MORADA: XXXXXXXXXX DATA: 10-06-2017  
 MÉDICO PRESCRITOR: XXXXXXXXXX VALIDADE: 6 meses  
 OPERADOR: Maria Virgínia VIA DE ADMINISTRAÇÃO: Oral  
 MODO DE CONSERVAÇÃO: Conservar à temperatura ambiente, no frasco bem fechado e ao abrigo da luz.

## MATERIAS PRIMAS:

MATÉRIA PRIMA	LOTE	ORIGEM	P.UNITÁRIO (Kg)	QUANTIDADE (g)	FACTOR (x)	CUSTO (€)
Acido fólico	160101-G-1	Acofarma	0,372400			0,00 €
Ántartato de cálcio	72951311	FarmaQuímica	0,026180			0,00 €
Biotina	161673-J-2	Acofarma	2,150000			0,00 €
Caféina	161218-G-1	Acofarma	0,024200	6,00	2,20	0,32 €
Carbonato de cálcio	161251-P-2	Acofarma	0,016500			0,00 €
Cloridrato de HCl	LH2725A	Jibe Recordat	0,041160			0,00 €
Clorato Potássio	14024-B02	Fagron Iberica	0,022240			0,00 €
Dapato	141656-I-3	Acofarma	1,239200			0,00 €
Espirulina	141863-P-6	Acofarma	0,038820			0,00 €
Ext. Alcaçofna	160890	Acofarma	0,071400			0,00 €
Ext. Boldo	160766-P-2	Acofarma	0,078510	6,00	2,20	1,01 €
Ext. Castanheira de Índia	160608-G-2	Acofarma	0,202000			0,00 €
Ext. Cassia Sagrada	161487-N-1	Acofarma	0,149440	6,00	2,20	1,88 €
Ext. Castanha Asáfrica	160817-P-2	Acofarma	0,103430			0,00 €
Ext. Chá Verde	120858-I-1	Acofarma	0,120200			0,00 €
Ext. Equisetum	160933-J-1	Acofarma	0,091000			0,00 €
Ext. Hoodia Gordonii	161027-I-1	Acofarma	0,611600			0,00 €
Ext. Laranja Amarga	160823-P-1	Acofarma	0,047190			0,00 €
Ext. Garcinia Cambogia	160866-N-2	Acofarma	0,060000			0,00 €
Ext. Sena (pd)	018-1025-02530	Fagron Iberica	0,205090	3,85	2,20	1,63 €
Ext. Fucus	151826-N-1	Acofarma	0,048720			0,00 €
Excipiente cápsulas	26-134-039488	Fagron Iberica	0,029290			0,00 €
Essência de Anis	161627-J-1	Acofarma	0,256600			0,00 €
Funaria	26-B01_288556	Fagron Iberica	0,208000			0,00 €
Gliconazina	160447-P-3	Acofarma	0,031060			0,00 €
Glicinato de zinco	161353-N-2	Acofarma	0,071620			0,00 €
Hidrocortisona	161842-G-4	Acofarma	0,340000			0,00 €
β-HTP (anirpifano)	L14080074	Fagron Iberica	3,900000			0,00 €
Ivermectina Uso Humano	160855-D-4	Acofarma	26,200000			0,01 €
L-Carnitina tartrato	161263-P-1	Acofarma	0,070660	18,00	1,00	2,63 €
Metformina	160358-N-1	Acofarma	0,048120			0,00 €
Nicotinato de nicotina	160799-D-2	Acofarma	7,210000			0,00 €
Riboflavina	161985-J-1	Acofarma	0,148200			0,00 €
Ext. Caralluma fimbriata	160735-J-1	Acofarma	0,222100			0,00 €
Silimarina	L14030091	Fagron Iberica	0,289900			0,00 €
Tapinonaf	16036816	HaloPharm	0,118330			0,00 €
Vitaminas C	160713-J-1	Acofarma	0,045300			0,00 €
Cápsulas verde-verde n° 00	160040-CB-4	Acofarma	0,112730			0,00 €
Cápsulas amarelo-laranja n° 00	161093-CB-2	Acofarma	0,116297			0,00 €
Cápsulas vermelhas n° 3	161732-CB-1	Acofarma	0,160998			0,00 €
Cápsulas amarelas n° 1	160870-CB-1	Acofarma	0,123948	9,24	2,20	2,52 €
Cápsulas verdes n° 1	141300-CA-2	Acofarma	0,131899			0,00 €
0	0	0	0,000000			0,00 €

TOTAL MATÉRIA PRIMA (A) 8,49 €

Rubrica do Supervisor

Ficha de manipulação de cápsulas

## CONTROLO DE QUALIDADE:

Ítem	Especificação	Resultado		Rubrica do operador
		Conforme	Não conforme	
<b>1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>				
1.1 Cor Verificar conformidade com a especificação	Pó castanho	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>[Handwritten signature]</i>
1.2 Odor Verificar conformidade com a especificação	Característico de L-Carnitina	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>[Handwritten signature]</i>
1.3 Aspecto Verificar conformidade com a especificação	Pó com aspecto homogéneo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>[Handwritten signature]</i>
<b>2. CONFORMIDADE COM A DEFINIÇÃO DA MONOGRAFIA "CÁPSULAS" DA FPVI</b>	Texto "2.9.5. Uniformidade de Massa das Preparações Apresentadas em Formas Farmacêuticas Unitárias" (FPVI, 1º Volume, Cap. Geral 2, 2.9 Métodos de Farmacotecnia)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>[Handwritten signature]</i>
<b>3. QUANTIDADE</b> Contar as cápsulas preparadas	120 cápsulas (quantidade prescrita)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>[Handwritten signature]</i>
Aprovado <input checked="" type="checkbox"/> Rejeitado <input type="checkbox"/> Supervisor <u><i>[Handwritten signature]</i></u> Data <u>10-04-2017</u>				

## ANOTAÇÕES:

Ficha de manipulação de cápsulas

## MANIPULAÇÃO:

	Forma Farmacéutica	Quantidade	P (€)	Factor multiplicativo	Valor (€)
Valor referente a quantidade base	Cápsulas	80	4,92 €	4,5	22,14 €
Valor adicional	Cápsulas	70	4,92 €	0,01	3,44 €
<b>TOTAL DA MANIPULAÇÃO (B)</b>					<b>25,58 €</b>

## MATERIAL DE EMBALAGEM:

Materiais de embalagem	Preço de aquisição (€)	Quantidade	Factor multiplicativo	Valor (€)
Frasco 100ml	0,72 €	1	1,2	0,86 €
<b>TOTAL DE MATERIAL DE EMBALAGEM (C)</b>				<b>0,87 €</b>

## P.V.P. DO MEDICAMENTO MANIPULADO:

Soma de: (A) + (B) + (C)	Factor multiplicativo	Valor (€)
35,90 €	1,3	46,73 €
		+ IVA ( 8% ) <u>2,81 €</u>
		<b>P.V.P. = <u>49,54 €</u></b>

Operador: ASSupervisor: [assinatura]

FEITO SEGUNDO A ARTE



## Anexo 2 – Documentação relativa à manipulação da pomada

	<b>Ficha de preparação de medicamentos manipulados</b>
---	--

**Medicamento:** Propionato de clobetasol – 30 mg; Ácido salicílico – 5g;  
Vaselina q.b.p. 100g







Teor em substância(s) ativa(s): 100g (ml ou unidades) contém 5 g (ml) de Ácido salicílico e  
0,03 g (ml) de propionato de clobetasol

Forma farmacêutica: pomada








Data de preparação: 19/04/2017

Número de lote: 4817

Quantidade a preparar: 100g

Matérias-primas	Nº de lote	Origem	Farmacopéia	Quantidade para 100g	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do operador	Rubrica do supervisor
Dermovate <sup>®</sup> pomada (0,5mg/g)	C794925	GSK	Edição: 12/2015	60 g	60g	59,888g		
Ácido salicílico	131156-D-1	Acofarma	Ph. Eur. 7	5g	5g	5,000g		
Vaselina branca	161740-P-1	Acofarma	Ph. Eur. RR	q.b.p. 100g	q.b.p. 100g	35,00g		

**Preparação**

1. Verificar o estado de limpeza do material.	
2. Descondicionar as 2 bisnagas de Dermovate <sup>®</sup> pomada e colocar diretamente no recipiente unguator.	
3. Pesar o ácido salicílico e adicionar ao recipiente unguator.	
4. Adicionar a vaselina sólida diretamente para o recipiente unguator até perfazer o peso final de 100 g.	
5. Executar a mistura no Unguator.	
6. Fechar o recipiente e rotular.	
7. Lavar e secar o material utilizado.	
8. _____	
9. _____	
10. _____	
11. _____	

	<b>Ficha de preparação de medicamentos manipulados</b>
---	--

Aparelhagem usada: Balança 2 – A e Balança 2 – B  
Unguator®

**Embalagem**

Tipo de embalagem: Unguator Capacidade do recipiente: 100/140 ml

Material de embalagem	Nº de lote	Origem
Unguator	S/N: 5AAAAA86F7E	Gako

Operador:   B  

**Prazo de utilização e Condições de conservação**

Condições de conservação: Conservar à temperatura ambiente, no recipiente bem fechado e ao abrigo da luz.

Operador:   B  

Prazo de utilização: 1 mês

Operador:   B  

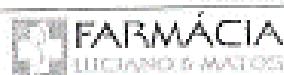
**Rotulagem**

1. Proceder à elaboração do rótulo de acordo com o modelo descrito em seguida.
2. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia, rubricada e datada, do rótulo da embalagem dispensada.

**Modelo de rótulo**

Identificação da Farmácia Identificação do Director Técnico Endereço e telefone da Farmácia	<b>DENOMINAÇÃO DO MEDICAMENTO</b>	Identificação do Médico prescriptor Identificação do doente
Textos substituídos (s) ou (s) (s) Quantidade dispensada Referência a outras gotas cujo conteúdo seja eventualmente necessário para a utilização conveniente do medicamento Posologia Via de administração		Data de preparação Prazo de utilização Condições de conservação Nº de lote Manter fora do alcance das crianças Advertências (precauções de manuseamento, etc.) Uso externo (caso se aplique) (em fita vermelha)

Operador:   B



## Ficha de preparação de medicamentos manipulados

## Verificação

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	Rubrica do operador
Cor	Branco	CONFORME	
Odor	Sem alteração	CONFORME	
Aspecto	Homogéneo	CONFORME	
Quantidade	100g $\pm$ 5%	CONFORME (99,21 g)	

Aprovado  Rejeitado

Supervisor: 19/04/2017

## Nome e morada do doente

## Nome do prescriptor

## Anotações

Utilizámos Demnovate pomada para obter o propionato de clobetasol por indicação do médico prescriptor.



## Ficha de preparação de medicamentos manipulados

## Cálculo do preço de venda

**MATÉRIAS-PRIMAS:**

Matéria-prima	Embalagem existente em armazém		Preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (sem IVA)		Quantidade a usar	Factor multiplicativo	Preço da matéria-prima utilizada na preparação	
	Quantidade utilizada	Preço de aquisição (€ IVA)	Quantidade unitária	preço				
Dermovax® pom.	-----	----- €	1 unid.	2,77 €	x 2	x -----	= 5,54 €	
Ácido salicílico	50g.	7,77 €	1g	0,00546 €	x 5g	x 2,2	= 0,17 €	
Vaselina branca	100g.	4,88 €	1g	0,0088 €	x 35g	x 1,5	= 0,46 €	
							<b>Total Matéria-Prima (A)</b>	<b>= 6,17 €</b>

**HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:**

	Forma Farmacéutica	Quantidade	F (€)	Factor multiplicativo	Valor	
Valor referente à quantidade base	pomada	100g	4,92 €	x 3	= 14,76 €	
Valor adicional				x 4,92 €	x 0,01	= €
					<b>Total da Manipulação (B)</b>	<b>= 14,76 €</b>

**MATERIAL DE EMBALAGEM:**

Material de embal. geom.	Preço de aquisição	Quantidade	Factor multiplicativo	Valor	
Unguentor 100/140ml	1,68 €	x 1	x 1,2	= 1,68 €	
				<b>Total do Material de Embalagem (C)</b>	<b>= 1,68 €</b>

**P. V. P. DO MEDICAMENTO MANIPULADO:**

Soma de (A) + (B) + (C)	Factor multiplicativo	Valor
22,61 €	x 1,3	= 29,39 €
	I. V. A.	+ 1,76 €
	(D)	= 31,15 €

**DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:**

Dispo. Tipo	Preço unitário	Quantidade	Valor
			<b>(E)</b>

**PREÇO FINAL: (D) + (E)** 31,15 €

Operador:

Supervisor:

**Parte B - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**  
**Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.**

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> - Estrutura química da molécula redaporfin .....	32
<b>Figura 2</b> - Espectro UV-Vis característico do redaporfin.....	35
<b>Figura 3</b> - Espectro FT-IR característico do redaporfin com identificação de ligações químicas	36

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Características gerais das CD naturais.....	33
<b>Tabela 2</b> - Métodos de caracterização existentes <i>in house</i> .....	35
<b>Tabela 3</b> - Dados dos químicos utilizados. ....	47
<b>Tabela 4</b> - Dados dos equipamentos utilizados.....	47
<b>Tabela 5</b> - Tabela resumo de moléculas da literatura e redaporfin.....	48

## **Abreviaturas**

CGTase: Ciclodextrina Glucanotransferase

CD: Ciclodextrinas

DLI: *Drug-to-Light Interval*

DSC: *Differential Scanning Calorimetry*

EC: Eficácia de Complexação

FDA: *Food and Drugs Administration*

FIQ: Fórum da Inovação e da Qualidade

FT-IR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GMP: *Good Manufacturing Practices*

HP: Hidroxipropil

HPLC: *High Pressure Liquid Chromatography*

IV: Intravenosa

$K_f$ : Constante de Formação dos complexos

MM: Massa Molecular

n: Estequiometria

OH: Hidroxilo

PDT: *Photodynamic Therapy*

PEG<sub>400</sub>: Polietilenoglicol 400

pKa: Constante de acidez

S: Solubilidade

SBE: Sulfobutiléter

SGQ: Sistema de Gestão da Qualidade

SWOT: *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## **I. Introdução**

O presente relatório consiste em grande parte no projeto laboratorial desenvolvido nos três meses de estágio. Em paralelo à execução do projeto laboratorial, participei na semana de acolhimento de novos colaboradores que consistia na visita às instalações da empresa bem como formações de apresentação dos diferentes departamentos e sobre diversos temas como a evolução da Bluepharma, qualidade e GMP, ambiente, saúde e segurança no trabalho, farmacovigilância, melhoria contínua e sobre sistemas de informação. Durante o período de estágio também tive a oportunidade de assistir a um Fórum da Inovação e da Qualidade (FIQ) sobre “Especificações da matéria-prima: como assegurar a *compliance* com o dossier aprovado” e a um *Science Talk* “Importância de Indicadores e métricas para o sucesso de uma organização”.

O projeto laboratorial foi realizado no setor de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico do departamento de Investigação e Inovação, e consistiu no desenvolvimento de uma formulação de redaporfina com recurso a ciclodextrinas de modo a aumentar a solubilidade do composto.

O estágio iniciou-se com uma contextualização do tema, nomeadamente sobre quais as ciclodextrinas aprovadas para uso intravenoso (IV), os métodos de produção e de caracterização dos complexos. Posteriormente estabeleceram-se os protocolos adequados aos métodos escolhidos e procedeu-se à execução laboratorial dos mesmos. Na parte final do estágio, realizou-se a caracterização dos produtos obtidos por espectroscopia UV-Vis e FT-IR.

Fora do contexto do projeto laboratorial, tive a oportunidade de contactar com outras técnicas como *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) e ensaios de dissolução.

Neste capítulo inicial revela-se a teoria subjacente ao projeto, nomeadamente a contextualização da molécula em estudo, ciclodextrinas (CD) de uso em IV, os métodos de produção e de caracterização do produto final.

## **2. Contextualização**

### **2.1. Terapia Fotodinâmica**

A *Photodynamic Therapy* (PDT) é um procedimento minimamente invasivo e aprovado clinicamente para o tratamento de diversos cancros, como do pescoço, pulmões, pele, entre outros (DĄBROWSKI e ARNAUT, 2015). Este procedimento inovador combina a utilização



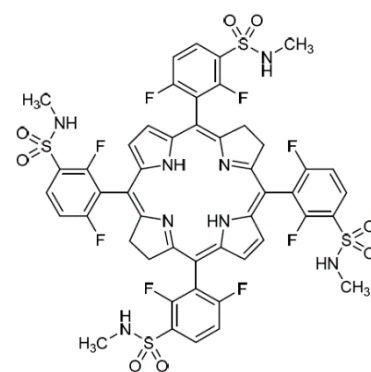
de luz, de um fotossensibilizador e oxigênio (ARNAUT *et al.*, 2014). A PDT consiste num processo de dois passos: primeiramente ocorre a administração do fotossensibilizador e de seguida após o intervalo *Drug-to-light* (DLI) o tecido é irradiado a um certo comprimento de onda ( $\lambda = 650 - 850 \text{ nm}$ ) (DĄBROWSKI e ARNAUT, 2015). A irradiação do tecido pode promover reações do tipo I, no qual o fármaco transfere um elétron para o Oxigênio molecular ou outros tipos de aceptores resultando na produção de aniões superóxido ou radicais; ou ocorrerem reações do tipo II em que o fármaco transfere a sua energia eletrónica para o Oxigênio no estado fundamental gerando oxigênio em singuleto (AGOSTINIS *et al.*, 2011) (DĄBROWSKI e ARNAUT, 2015).

De acordo com a literatura, a geração de radicais de oxigênio terá três efeitos biológicos distintos que contribuem para uma terapia antineoplásica eficaz: bloqueio vascular e consequente morte por isquemia dos tecidos tumorais, morte das células tumorais por indução de stress oxidativo no seu interior e reação local e sistémica inflamatória que estimula a ativação de células T e a geração de memória celular e resposta sistémica (AGOSTINIS *et al.*, 2011).

Existem diversos fotossensibilizadores sintéticos como Porphirinas, Clorinas, Bacterioclorinas e Ftalocianinas (DĄBROWSKI e ARNAUT, 2015).

## 2.2. Redaporfin

O redaporfin (Figura 1) é um fotossensibilizador sintético baseado no macrociclo das bacterioclorinas, de Massa Molecular (MM) de 1135,11 g/mol, que combina as características das bacterioclorinas com a fotoestabilidade através da introdução de grupos Flúor (F) nas posições *-orto* de anéis fenílicos das tetrafenilbacterioclorinas, aumentando assim o potencial de oxidação (DĄBROWSKI e ARNAUT, 2015). Os grupos sulfonamida presentes nas posições *-meta* dos anéis fenilo atribuem anfifilicidade (DĄBROWSKI e ARNAUT, 2015). O redaporfin está indicado para o tratamento do cancro da cabeça e do pescoço (DĄBROWSKI e ARNAUT, 2015).



**Figura 2-** Estrutura química da molécula redaporfin.

O redaporfin apresenta como principais características a promoção de reações do tipo I e II, localização no retículo endoplasmático e na mitocôndria das células e um DLI de 15 minutos (DĄBROWSKI e ARNAUT, 2015).

## 2.3. Ciclodextrinas

### 2.3.1. Características gerais, vantagens e desvantagens

As ciclodextrinas (CD) são oligossacáridos de origem natural obtidos pela degradação enzimática do amido pela enzima Ciclodextrina Glucanotransferase (CGTase) (LOFTSSON *et al.*, 2005) (MURA, 2014) .

Molecularmente caracterizam-se por unidades repetidas do açúcar D-Glucopiranosose ligadas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 (LOFTSSON *et al.*, 2005) (MURA, 2014) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a), que são responsáveis pela forma de cone truncado que adquirem (MURA, 2014) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a). Na extremidade mais larga, existem grupos hidroxilo (OH) secundários, enquanto que na extremidade mais estreita existem grupos OH primários (LOFTSSON *et al.*, 2005) (MURA, 2014) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a). Estes grupos polares vão favorecer a solubilidade aquosa. As CD são moléculas anfifílicas uma vez que o seu interior é hidrofóbico e o seu exterior hidrofílico, podendo assim veicular fármacos hidrofóbicos no seu interior e aumentar a sua solubilidade aquosa (LOFTSSON *et al.*, 2005) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a).

Existem três tipos principais de CD naturais:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (MIRANDA *et al.*, 2011) (MURA, 2014) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a). As características estão resumidas na tabela I.

**Tabela I** - Características gerais das CD naturais.

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Número de unidades de açúcar	6	7	8
Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	972	1135	1297
Solubilidade aquosa (g/ 100 ml a 25 °C)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Volume da cavidade (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
pKa	12,332	12,202	12,081
Temperatura de fusão (°C)	275	280	275

Adaptado de SALTÃO e VEIGA (2001)

As CD permitem a formação de dois tipos de complexos: de inclusão e de não inclusão. Os complexos de inclusão formam-se através de interações termodinâmicas estáveis, sendo que em primeiro lugar há a saída das moléculas de água do interior da cavidade o que conduz a um maior número de ligações de Hidrogénio disponíveis (MIRANDA *et al.*, 2011) (GIDWANI e VYAS, 2015) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a). A molécula a complexar tem geralmente um carácter hidrofóbico e por isso promove a repulsão entre a molécula de interesse e o meio aquoso. Durante o processo de complexação ocorre diminuição dessa mesma repulsão culminando com a entrada gradual da molécula “convidada” para o interior da cavidade da CD (MIRANDA *et al.*, 2011) (GIDWANI e VYAS, 2015) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a).

O uso de CD tem como vantagens o aumento da solubilidade aquosa, aumento da estabilidade física e química, aumento da biodisponibilidade, melhoria das qualidades organolépticas como odor e sabor, diminuição da reação local após administração e permite ainda a conversão de formulações líquidas em sólidas (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a). No caso das  $\alpha$  e  $\beta$ -CD, a toxicidade renal (quando administradas por via IV) é uma desvantagem tal como a baixa solubilidade aquosa apresentada pelas  $\beta$ -CD (JAMBHEKAR e BREEN, 2016a).

### **2.3.2. Métodos de produção de complexos de inclusão**

Os complexos de inclusão podem ser produzidos através de diferentes métodos, dependendo das propriedades da substância ativa, da cinética de equilíbrio, dos excipientes e de qual a forma farmacêutica final.

Segundo a revisão da literatura efetuada, existem nove métodos principais para a produção de complexos de inclusão: Co-precipitação (VALLE, 2004), Sistema Etanol-água (MICLEA *et al.*, 2010) Extrusão (VALLE, 2004), *Slurry complexation* (VALLE, 2004), *Dry mixing* (VALLE, 2004) (JAFARI, 2017), Evaporação de solvente (JAFARI, 2017), *Paste complexation* (VALLE, 2004) (JAFARI, 2017), *Damp mixing and heating* (VALLE, 2004) e Liofilização (MANGOLIM *et al.*, 2014).

Tendo em conta a molécula em estudo e os equipamentos disponíveis na empresa, os métodos escolhidos para a formação dos complexos de inclusão foram a co-precipitação, *paste complexation* e a evaporação de solvente. No capítulo 3, os métodos serão apresentados mais detalhadamente.

### 2.3.3. Métodos de caracterização dos complexos de inclusão

Existem diferentes métodos de caracterização dos complexos obtidos que se baseiam na detecção de características físicas e químicas da molécula de interesse como consequência da complexação.

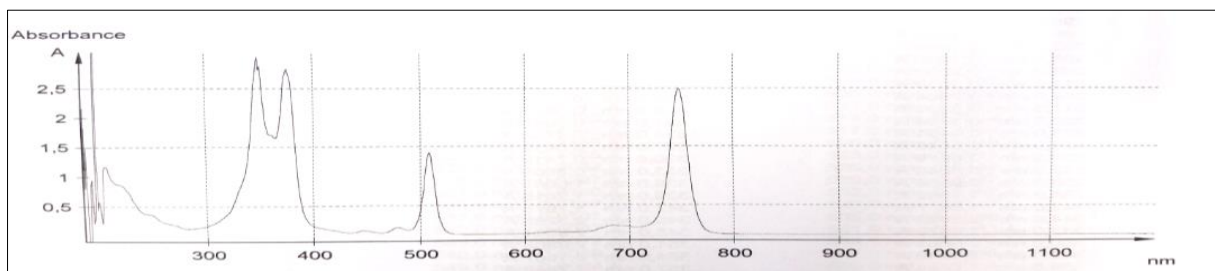
Os métodos de caracterização permitem conhecer parâmetros como a estequiometria ( $n$ ), a constante de formação do complexo ( $K_f$ ), a Eficácia de Complexação (EC) e a solubilidade (S) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016b).

**Tabela 2** - Métodos de caracterização existentes *in house*.

Métodos	Parâmetros
Espectroscopia UV-VIS	Estequiometria ( $n$ ) e Constante de Formação ( $K_f$ )
HPLC	Estequiometria ( $n$ ) e Constante de Formação ( $K_f$ )
Polarimetria	Estequiometria ( $n$ ) e Constante de Formação ( $K_f$ )
Espectroscopia de fluorescência	Estequiometria ( $n$ ) e Constante de Formação ( $K_f$ )
FT-IR	Elucidação da estrutura/ ligações químicas
DSC	Elucidação da estrutura/ ligações químicas e Entalpia ( $\Delta H$ )

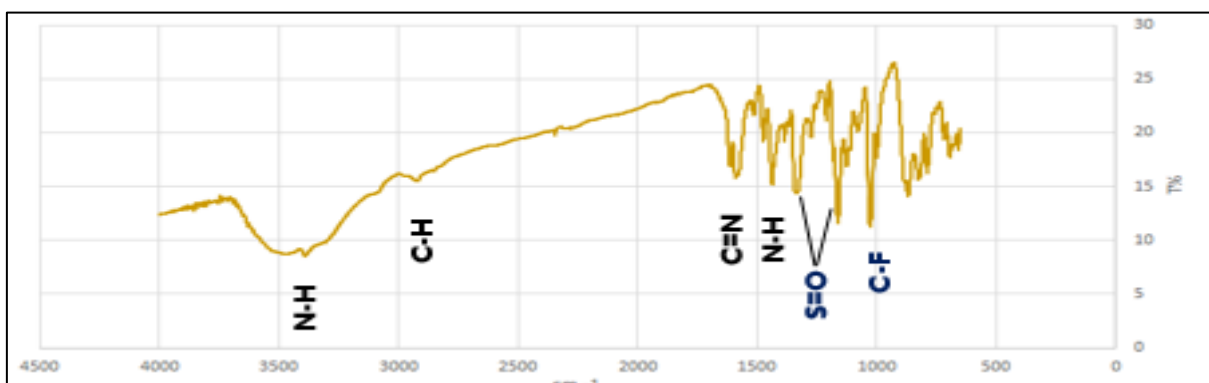
Os produtos foram avaliados por espectroscopia UV-Vis e por FT-IR.

A espectroscopia UV-Vis permite verificar a presença de redaporfin através da análise do espectro característico da mesma (Figura 2) e a quantificação da mesma através de uma reta de calibração.



**Figura 3** - Espectro UV-Vis característico do redaporfin.

A análise por FT-IR permite observar se ocorreu complexação devido a alterações no espectro do redaporfin, como diminuição da intensidade de picos e ausência dos mesmos (GEORGE e VASUDEVAN, 2012)



**Figura 4** - Espectro FT-IR caraterístico do redaporfin com identificação de ligações químicas (A azul estão as ligações que são específicas do redaporfin).

#### 2.3.4. Ciclodextrinas para administração Intravenosa aprovadas pela FDA

Para administração Intravenosa (IV), estão aprovadas pela FDA para uso humano a Hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD), Sulfobutiléter- $\beta$ -CD (SBE-  $\beta$ -CD) e a  $\gamma$ -CD<sup>2</sup>

A formulação de CD com grupos substituintes como o HP e o SBE, vão atribuir características diferentes da molécula mãe (JAMBHEKAR e BREEN, 2016). Com as HP- $\beta$ -CD, a molécula permanece neutra, aumentando a solubilidade aquosa e diminuindo a higroscopicidade, ficando mais estável à humidade (MIRANDA *et al.*, 2011). As SBE- $\beta$ -CD são CD ionizáveis pois este grupo substituinte tem uma cabeça polar negativa que está associada a uma cauda hidrofóbica, presente no interior da cavidade (MIRANDA *et al.*, 2011). Estes grupos exercem uma repulsão electrostática aumentando as propriedades hidrofóbicas, a capacidade de complexação e a capacidade solubilizante (MIRANDA *et al.*, 2011) (JAMBHEKAR e BREEN, 2016). Sendo moléculas ionizáveis, tem de se ter em atenção ao pH de trabalho, devendo este ser neutro ou alcalino (MIRANDA *et al.*, 2011).

No próximo capítulo é abordado o trabalho laboratorial executado com apresentação de resultados e conclusões.

<sup>2</sup> Consultado na “Inactive ingredients database” da FDA, a 15/05/2017

### 3. Trabalho laboratorial

#### 3.1. Escolha da CD

Como referido anteriormente, apenas três CD estão aprovadas pela FDA para uso IV: HP- $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD. Optou-se pela HP- $\beta$ -CD uma vez que apesar da  $\gamma$ -CD apresentar um diâmetro de cavidade superior, a sua solubilidade é muito mais baixa (23,3 g/ 100 ml a 25 °C face a 70 g/ 100 ml a 25 °C<sup>3</sup>). A SBE- $\beta$ -CD não estava disponível aquando a execução do projeto.

#### 3.2. Escolha do método

A escolha do método foi limitada aos equipamentos disponíveis e aos solventes necessários. Optou-se pelo método da co-precipitação, *paste complexation* e a evaporação de solvente.

A co-precipitação é um método rápido e simples, é uma *one-pot-reaction* e é o método laboratorial mais comum, no entanto apresenta a grande desvantagem de ter um *Scale-up* limitado (VALLE, 2004).

A *Paste complexation* consiste na formação de uma pasta de CD e de redaporfin, com pequena quantidade de solvente, promovendo a formação de complexos através de malaxagem (VALLE, 2004) (JAFARI, 2017). Para além do *Scale-up* ser possível, recorre a um pequeno volume de solvente o que é vantajoso tendo em conta a baixa solubilidade do redaporfin. A tendência a formar *bulk* é uma desvantagem, tendo por isso de se recorrer a um aumento de temperatura para diminuir a viscosidade da pasta formada (VALLE, 2004) (JAFARI, 2017).

O método de evaporação de solvente consiste na mistura da molécula e das CD com um solvente/mistura de solventes em que ambas são solúveis. Após algum tempo em agitação evaporam-se os solventes de modo a obter cristais de complexos de inclusão (JAFARI, 2017).

Relativamente aos métodos escolhidos para avaliar a formação de complexos de inclusão, optou-se por espectroscopia UV-Vis devido à simplicidade e rapidez na execução e FT-IR por permitir uma análise mais específica e sensível.

---

<sup>3</sup> Consultado no site do fornecedor Ashland a 25/05/2017.

### 3.3. Escolha dos solventes a utilizar nos diferentes métodos

A escolha dos solventes teve por base as características de ambas as moléculas (CD e o redaporfin). Após se testar a solubilidade das moléculas em diferentes solventes, optou-se pela mistura Polietilenoglicol (PEG) 400: Etanol absoluto (80%: 20%), Água: Acetona (50%: 50%), Diclorometano: Metanol (75%: 25%) e Etanol absoluto.

Nos protocolos é comum a adição de NaCl 0,9% que atua como agente discriminatório, uma vez que permite separar as moléculas livres das complexadas dado que as moléculas complexadas têm solubilidade aquosa.

### 3.4. Resultados

#### 3.4.1. *Paste complexation*

O método *paste complexation* apresenta alguns problemas à escala laboratorial, pois é de difícil execução não só devido ao tempo de mistura como também devido às quantidades utilizadas que dificultam a mesma. Para a realização deste método desenvolveram-se dois protocolos recorrendo-se à mistura de solventes PEG<sub>400</sub>: Etanol absoluto (80%: 20%) e a Etanol absoluto. Relativamente ao protocolo que utilizou o solvente PEG<sub>400</sub>: Etanol absoluto (80%: 20%), não foi possível a obtenção de um pó solto após a secagem uma vez que a presença do polímero conferiu viscosidade à mistura. No protocolo em que se utilizou o solvente Etanol absoluto, já não houve esse problema dado que o etanol é volátil.

Em ambos os protocolos, após a adição de 1 ml de NaCl 0,9%, observou-se que se formava uma mistura de cor verde baça e com precipitado. Após a centrifugação, verificou-se a formação de um depósito de cor verde e de um sobrenadante de cor incolor. Estes resultados indicavam a não formação de complexos de inclusão, uma vez que após a adição de uma solução aquosa, se tivesse ocorrido a formação de complexos de inclusão, estes seriam solúveis e conseqüentemente o sobrenadante apresentaria uma cor verde.

As amostras foram analisadas por espectroscopia UV-Vis e por FT-IR. A análise do sobrenadante por espectroscopia UV-Vis não revelou a presença dos picos característicos do redaporfin e por isso pode-se concluir que a concentração de redaporfin no sobrenadante estava abaixo do limite de deteção.

A análise FT-IR dos sobrenadantes e precipitados de ambos os protocolos revela a ausência de complexos de inclusão. Ambos os precipitados apresentam os picos característicos da HP-β-CD e de redaporfin. Os sobrenadantes diferem entre si, uma vez que o espectro do

sobrenadante resultante do protocolo com PEG<sub>400</sub>: Etanol absoluto (80%: 20%) é equivalente ao espectro do NaCl 0,9%, estando ausentes tanto os picos característicos da HP-β-CD como do redaporfin, contrariamente ao esperado. O espectro do sobrenadante do protocolo que recorreu a Etanol absoluto continha os picos característicos da HP-β-CD.

### 3.4.2. Co-precipitação

O método da co-precipitação é dos métodos mais usados à escala laboratorial para produção de complexos de inclusão devido à sua simplicidade de execução e por isso foi um dos métodos escolhidos. Através deste método executaram-se diferentes protocolos com recurso a diferentes solventes como PEG<sub>400</sub>: Etanol absoluto (80%: 20%), Acetona: Água (50%: 50%) e Etanol absoluto.

No primeiro protocolo executado, recorreu-se ao solvente PEG<sub>400</sub>: Etanol absoluto (80%: 20%) e tal como foi explicitado anteriormente, a adição de NaCl 0,9% é o fator diferenciador entre os complexos formados e as moléculas livres. Neste primeiro protocolo optou-se por subdividir a mistura final em 2 alíquotas de modo a testar qual o efeito da concentração na variação do rácio volume de mistura/ volume de NaCl 0,9%. Escolheram-se os rácios volume de mistura/ volume de NaCl 0,9% de 2:98, 3:97, 5: 95, 10: 90 e 50: 50. Após a centrifugação, apenas o rácio 50:50 (volume de mistura/ volume de NaCl 0,9%) apresentou um sobrenadante de cor verde.

Na análise por UV-Vis apenas o sobrenadante do rácio 50:50 apresentou um valor acima do limite de deteção do espectrofotómetro. Tendo conhecimento da solubilidade do redaporfin em etanol absoluto, o valor obtido não variou significativamente, o que previamente indicava a ausência de complexos de inclusão. A análise por FT-IR suportou a conclusão de não inclusão.

No segundo protocolo, testou-se a mistura de solventes Acetona: Água (50%: 50%), que se pensou ser uma boa alternativa uma vez que a mistura permitia a solubilização de ambas as moléculas. Este método teve a variante de em vez se utilizar NaCl 0,9% como solução discriminatória, recorreu-se à evaporação da acetona que permitiria que as moléculas ficassem em meio aquoso e assim podia-se avaliar igualmente a formação de complexos de inclusão. No fim do tempo de mistura, obteve-se um sobrenadante de cor verde. Após a evaporação da acetona, obteve-se um sobrenadante incolor, o que era indicativo da ausência de complexos de inclusão no sobrenadante. A leitura do sobrenadante no espectrofotómetro UV-Vis não revelou a presença de redaporfin no sobrenadante. A leitura no FT-IR



complementou essa informação, mas também permitiu verificar a ausência de CD do sobrenadante, algo que é inesperado tendo em conta a solubilidade aquosa da HP- $\beta$ -CD.

O terceiro e o quarto protocolo deste método utilizaram Etanol absoluto com solvente de mistura. O quarto protocolo difere do terceiro na medida em que antes da adição de NaCl 0,9% se procede à evaporação do etanol até à *secura*. Este passo adicional tem por objetivo avaliar qual o possível papel do NaCl 0,9% como promotor de descomplexação.

Após o tempo de mistura, os sobrenadantes de ambos os protocolos foram quantificados com recurso a espectroscopia UV-Vis. Os valores obtidos não alteraram significativamente em relação à solubilidade do redaporfin em Etanol absoluto. A adição do NaCl 0,9% contribuiu para a formação de sobrenadantes incolores, o que revelava a ausência de complexos de inclusão.

No quarto protocolo efetuou-se a medição por FT-IR do sobrenadante e do precipitado antes da adição do NaCl 0,9%. O sobrenadante e o precipitado demonstraram a presença dos picos característicos da HP- $\beta$ -CD e do redaporfin, porém não ocorreu uma alteração maior no espectro que revelasse a formação de complexos de inclusão antes da adição de NaCl 0,9%. Ambos os precipitados finais apresentam os picos característicos da HP- $\beta$ -CD e de redaporfin. Os sobrenadantes finais diferem entre si, uma vez que o espectro do sobrenadante resultante do quarto protocolo é equivalente ao espectro do NaCl 0,9%, estando ausentes tanto os picos característicos da HP- $\beta$ -CD como do redaporfin.

### **3.4.3. Evaporação de solvente**

Neste protocolo, recorreu-se à mistura de solventes Diclorometano: Metanol (75%: 25%). Estes solventes pertencem à classe 2 segundo a ICH (possuem toxicidade inerente), porém foram testados para se estudar a influência destes solventes na eficácia de complexação.

A adição de NaCl 0,9% contribuiu para a obtenção de um sobrenadante incolor, o que refletia a não complexação e por isso não se procedeu à análise por espectroscopia UV-Vis. O sobrenadante e o precipitado foram analisados por FT-IR. O espectro do sobrenadante era sobreponível com o espectro do NaCl 0,9%, estando ausentes os picos característicos da HP- $\beta$ -CD e do redaporfin. Por sua vez, o precipitado apresentava os picos característicos de ambas as moléculas.

### 3.5. Considerações finais

A análise global dos resultados obtidos, permite desde já concluir que não ocorreu formação de complexos de inclusão entre as HP- $\beta$ -CD e o redaporfin. Quer a análise por espectroscopia quer a análise por FT-IR suportou esta conclusão.

Quando se iniciou a análise dos espectros por FT-IR tendo as duas moléculas no precipitado pensou-se que pudessem existir complexos de inclusão e que estes pudessem estar no precipitado pois apesar de ocorrer complexação esta poderia não ter surtido num aumento da solubilidade. No entanto, segundo diversos autores, quando ocorre complexação, os picos característicos das moléculas complexadas sofrem alterações, como a diminuição da intensidade do pico (GEORGE e VASUDEVAN, 2012) e/ou deslocamento do mesmo (LIN *et al.*, 2010). A comparação entre os espectros das amostras e o espectro do redaporfin, demonstrou que não ocorreu nenhuma alteração *major* que justificasse a existência de complexos de inclusão.

Os espectros de FT-IR, para além de permitirem analisar a presença/ausência de complexos de inclusão, também permitiram retirar conclusões interessantes como por exemplo o efeito da temperatura. Nos protocolos que foram submetidos a temperaturas  $\geq 40$  °C (protocolo 1 da *paste complexation*, protocolos 2 e 4 da co-precipitação e protocolo da evaporação de solvente), os espectros dos sobrenadantes eram sobreponíveis com o espectro do NaCl 0,9%. As HP- $\beta$ -CD apresentam um ponto de fusão de 120 °C – 160 °C<sup>4</sup> e o redaporfin não se degrada às presentes temperaturas. Por isso, uma das hipóteses propostas é a decorrer algum tipo de interação, diferente de complexos de inclusão, que leve à precipitação da HP- $\beta$ -CD juntamente com o redaporfin. Esta conclusão necessita de validação bibliográfica. De modo a avaliar quais as interações aqui presentes, dever-se-ia de analisar as amostras não só através dos métodos anteriormente descritos, mas também por DSC uma vez que permitirá saber quais os tipos de ligações envolvidas.

Durante a realização do trabalho laboratorial, foi proposto que talvez a adição de NaCl 0,9% promovesse a descomplexação, sendo este o passo o responsável pela não complexação nos produtos finais, uma vez que quando a constante de equilíbrio é baixa, uma simples diluição pode conduzir à descomplexação (STELLA *et al.*, 1999) (STELLA e HE, 2008) . No quarto protocolo da Co-precipitação, tal como foi mencionado anteriormente, as amostras foram analisadas por FT-IR antes do passo de adição de NaCl 0,9% e foi comprovado que neste

---

<sup>4</sup> Consultado <https://www.wacker.com/cms/en/products/product/product.jsp?product=8969> a 21/07/2017

passo não tinha ocorrido a formação de complexos de inclusão e por isso o NaCl 0,9% não era o fator que estava a influenciar a complexação.

Finalmente, no caso do protocolo relativo ao método de evaporação do solvente não se obtiveram complexos de inclusão, no entanto não se sabe se é devido à ineficácia dos solventes ou se o facto de ter sido submetido a 40 °C possa ter influenciado o resultado.

Das moléculas complexadas com HP- $\beta$ -CD descritas na literatura, geralmente estas apresentam um peso molecular até 600 g/mol, nunca um peso molecular tão elevado como o redaporfin. Para além do peso molecular, a molécula em estudo é bastante hidrofóbica o que também dificulta a complexação.

Pensou-se que a HP- $\beta$ -CD pudesse não ser a CD mais indicada devido ao elevado peso molecular da redaporfin, todavia ZHANG *et al.* (2009) conseguiu complexar a insulina (1380 g/mol) com HP- $\beta$ -CD, o que demonstra a eficácia desta CD na complexação de moléculas de grandes dimensões. Porém, a insulina é hidrofílica e por isso a complexação é facilitada. Acrescida à elevada lipofilicidade, o redaporfin apresenta uma estrutura não planar que possivelmente não facilita a complexação.

Assim sendo, a estrutura não planar e a elevada hidrofobicidade provavelmente são os fatores chave para ainda não se ter conseguido obter complexos de inclusão entre HP- $\beta$ -CD e redaporfin (Tabela 5).

#### **4. Análise SWOT**

A análise SWOT consiste na avaliação das *Strenghts* (Forças), *Weaknesses* (Fraquezas), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças) relativas ao período de estágio.

##### **4.1. Strenghts (Forças)**

As forças que posso destacar relativamente ao estágio são:

- *Know-how* na execução de protocolos laboratoriais e no manuseamento do espectrofotómetro UV/Vis;
- Bom ambiente e colaboração entre colegas;
- Formação contínua e integração do estagiário na entidade através da realização da semana de acolhimento;
- Recursos materiais disponibilizados para a realização do projeto;
- *Know-how* interno.

#### **4.2. Weaknesses (Fraquezas)**

Relativamente às fraquezas, destaco:

- *Know-how* limitado para manusear alguns equipamentos;
- Falta de experiência em apresentação dos materiais de estudo oralmente.

#### **4.3. Opportunities (Oportunidades)**

Relativamente às oportunidades, posso salientar:

- Contacto com o mercado de trabalho;
- Contacto com a realidade de investigação em indústria farmacêutica;
- Trabalho em contexto de Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ);
- Aquisição de novos conhecimentos acerca de equipamentos, como o caso do FT-IR;
- Aprofundar conhecimentos gerais anteriormente adquiridos acerca das ciclodextrinas;
- Aprofundar os conhecimentos em Excel;
- Alargar a rede de *networking*;
- Desenvolver a capacidade de apresentação oral;
- Adquirir mais conhecimento em técnicas de investigação e de análise.

#### **4.4. Threats (Ameaças)**

- Curto tempo de estágio (3 meses), que em contexto de investigação limita a realização do projeto.

## 5. Considerações finais acerca do estágio

O estágio no setor de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico do departamento de Investigação e Inovação da Bluepharma excedeu as expectativas iniciais, uma vez que contrariamente ao que pensava, iria participar ativamente num projeto de investigação. O projeto foi bastante interessante por diversas razões, tais como: a indicação terapêutica do redaporfin, o contacto com um meio laboratorial mais tecnológico, a obtenção de novos conhecimentos e o desafio de analisar resultados inesperados com espírito crítico. A equipa foi essencial uma vez que para além de me fazerem sentir integrada, sempre se esforçaram para transmitir os conhecimentos da melhor forma.

Em termos pessoais, as apresentações periódicas ajudaram-me a expressar melhor a informação, dado que a exposição me ajudou a sentir mais à vontade perante uma audiência. O estágio também contribuiu para refletir na aquisição de formação adicional mais específica como por exemplo no mestrado em Química Farmacêutica Industrial.

Em modo de conclusão, este estágio foi uma excelente oportunidade de contactar com o contexto de investigação em indústria, pois apesar de já possuir experiência em investigação no meio académico, a dinâmica das mesmas é muito diferente. O estágio foi bastante importante na reflexão acerca da visão da área de investigação em contexto de indústria como uma futura oportunidade de carreira.

## Bibliografia

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HANH, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. - Photodynamic Therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin.** 6: 4 (2011) 250–281.

ARNAUT, L. G.; PEREIRA, M. M.; DĄBROWSKI, J. M.; SILVA, E. F. F.; SCHABERLE, F. A.; ABREU, A. R.; ROCHA, L. B.; BARSAN, M. M.; URBAŃSKA, K.; STOCHEL, G.; BRETT, C. M. A. - Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: The role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers. **Chemistry - A European Journal.** 20: 18 (2014) 5346–5357.

DĄBROWSKI, J. M.; ARNAUT, L. G. - Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. **Photochemical & Photobiological Sciences.** 14: 10 (2015) 1765–1780.

FDA - **Inactive Ingredient Database** [Em linha] [Consult. 2 maio. 2017] Disponível em <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>

GEORGE, S.; VASUDEVAN, D. - Studies on the Preparation, Characterization, and Solubility of 2-HP-beta-Cyclodextrin-Mecizine HCl Inclusion Complexes. **Journal of Young Pharmacists.** 4: 4 (2012) 220–227.

GIDWANI, B.; VYAS, A. - A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. **BioMed Research International.** 2015.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. - Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today.** 21: 2 (2016) 356–362.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. - Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: Solubilization, binding constant, and complexation efficiency. **Drug Discovery Today.** 21: 2 (2016) 363–368.

LIN, S. Y.; HSU, C. H.; SHEU, M. T. - Curve-fitting FTIR studies of loratadine/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex induced by co-grinding process. **Journal of**

**Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 53: 3 (2010) 799–803.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. - Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics.** 302: 1–2 (2005) 18–28.

MANGOLIM, C. S.; MORIWAKI, C.; NOGUEIRA, A. C.; SATO, F.; BAESSO, M. L.; NETO, A. M.; MATIOLI, G. - Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **Food Chemistry.** 153. (2014) 361–370.

MICLEA, L. M.; VLAIA, L.; VLAIA, V.; HĂDĂRUGĂ, D. I.; MIRCIOIU, C. - Preparation and Characterisation of Inclusion Complexes of Meloxicam and Alpha-Cyclodextrin and Beta-Cyclodextrin. **Farmacia.** 58: 5 (2010) 583–593.

MIRANDA, J. C.; MARTINS, T. E. A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H. G. - Cyclodextrins and ternary complexes: Technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** 47: 4 (2011) 665–681.

MURA, P. - Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 101. (2014) 238–250.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. - Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** 37: 1 (2001) 1–17.

SEID MAHDI JAFARI - **Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients: Principles and Applications.** 1<sup>a</sup> Ed. Academic Press, 2017. ISBN 9780128097403.

STELLA, V. J.; RAO, V. M.; ZANNOU, E. A.; ZIA, V. - Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 36: 1 (1999) 3–16.

STELLA, V. J.; HE, Q. - Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology.** 36: 1 (2008) 30–42.

VALLE, E. M. M. - Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry.** 39: 9 (2004) 1033–1046.

ZHANG, L.; ZHU, W.; SONG, L.; WANG, Y.; JIANG, H.; XIAN, S.; REN, Y. - Effects of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on in vitro insulin stability. **International Journal of Molecular Sciences.** 10: 5 (2009) 2031–2040.

**Anexos****Anexo I – Dados dos químicos utilizados****Tabela 3** - Dados dos químicos utilizados.

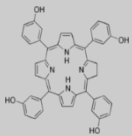
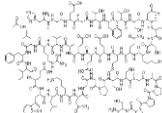
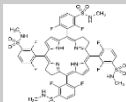
<b>Químico</b>	<b>Lote</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Acetona</b>	K43800414239	Merck KGaA – Alemanha
<b>Cavitron™ W7 HP7 Pharma</b>	A1411A0068	Ashland Industries Europe GmbH – Suíça
<b>Cloreto de Sódio</b>	K45487407424	Merck KGaA – Alemanha
<b>Diclorometano</b>	1681303 / 1678091	Fisher Scientific – Reino Unido
<b>Etanol absolute</b>	1710254	Fisher Scientific – Reino Unido
<b>Metanol</b>	1863807647	Merck KGaA – Alemanha
<b>PEG<sub>400</sub></b>	56635385	Merck KGaA – Alemanha

**Anexo II – Dados dos equipamentos utilizados****Tabela 4** - Dados dos equipamentos utilizados.

<b>Equipamentos</b>	<b>Referência</b>	<b>Nº interno BLPH</b>
<b>Agitador magnético</b>	Variomag poly – Thermo Scientific	634
<b>Centrifuga</b>	Eppendorf centrifuge 5810R	ID 266
<b>Espetrofotômetro</b>	Analitykjena Specord 210 plus	1070
<b>Estufa a vácuo</b>	Vacutherm Heraeus Instruments	107
<b>Evaporador rotativo</b>	Laborota 4003 – control Heidolph instruments	ID 244
<b>FT-IR-ATR</b>	Spectrum two	1022



**Anexo III – Tabela resumo de moléculas da literatura e do redaporfin****Tabela 5 - Tabela resumo de moléculas da literatura e redaporfin.**

<b>Molécula</b>	<b>MW (g/mol)</b>	<b>Hidrofilicidade</b>	<b>Conformação</b>	<b>HP-β-CD</b>
 <p><b>Foscan®</b></p>	680,74	Baixa	Planar	<b>Sim</b>
 <p><b>Insulin</b></p>	1380	Elevada	Planar	<b>Sim</b>
 <p><b>redaporfin</b></p>	1135,11	Baixa	Não – planar	<b>Não</b>

Parte C - Monografia

“Oxysterols and their effects: the good, the bad and the not so ugly”

**List of figures**

**Figure 1** - Biosynthesis of common oxysterols. ....57

**Figure 2** - Effects of vitamin E on 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol induced cell death ..... 61

**Figure 3** - 5,6 – epoxycholesterol.....65

**Figure 4** - Mechanism of cytotoxicity and biosynthesis of TAG promoted by 5,6-EC and 5,6-ECS.....66

**Figure 5** - Dendrogenin A. ....67

**Figure 6** - General structure of Nuclear Receptors.....68

## Abbreviations

ABC: ATP-Binding Cassette

AEBS: Microsomal Antiestrogen Binding Site

Apo: Apolipoprotein

BC: Breast Cancer

CCI: Chemokine C-C Motif Ligand

CCN: Cyclin

CETP: Cholesteryl Ester Transfer Protein

ChEH: Cholesterol Epoxide Hydrolase

CORO: Coronin

DBD: DNA Binding Domain

DDA: Dendrogenin A

DHA: Docosahexaenoic Acid

EMT: Epithelial to Mesenchymal Transitions

EPA: Eicosapentaenoic Acid

ER: Estrogen Receptor

FAS: Fatty Acid Synthase

FXR: Farnesoid-X-Receptor

G-CSF: Granulocyte Colony - Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony - Stimulating Factor

HDL: High-Density Lipoprotein

His: Histidine

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA

IDOL: Inducible Degradator of LDLR

IFN: Interferon

IL: Interleukin

LBD: Ligand Binding Domain

LDL: Low-Density Lipoprotein

LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor

LPCAT: Lysophosphatidylcholine Acyltransferase

LPS: Lipopolysaccharide

LXR: Liver-X-Receptor

LXREs: Liver-X-Receptor Response Elements

M-CSF: Macrophage Colony - Stimulating Factor

MCF: Michigan Cancer Foundation  
MCP: Monocyte Chemoattractant Protein  
MERKT: Mer proto-oncogene Tyrosine Kinase  
MMPs: Matrix Metalloproteinases  
MDM2: Mouse Double Minute 2  
NCOR: Nuclear Co-Repressor  
NK: Natural Killer  
NO: Nitrous Oxide  
NPC1L1: Niemann Pick C1-Like 1  
NR: Nuclear Receptor  
PUFA: Polyunsaturated Fatty Acid  
PXR: Pregnane-X-Receptor  
Rb: Retinoblastoma  
RCT: Reverse Cholesterol Transport  
ROS: Reactive Oxygen Species  
RXR: Retinoid-X-Receptors  
SCD: Stearoyl-CoA Desaturase  
SERM: Selective Estrogen Receptor Modulator  
SKp2: S-phase associated Kinase protein-2  
SRBI: Scavenger Receptor Type BI  
SREBP: Sterol Regulatory Binding Protein  
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription  
TAM: Tamoxifen  
TAG: Triacylglycerol  
TCR: T cell receptor  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
UV: Ultra-Violet  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
VLDL: Very-Low-Density Lipoprotein

**Abstract**

Oxysterols, oxygenated derivatives of cholesterol, are compounds with 27 structural carbons, substituted with polar groups as hydroxyl, keto, hydroperoxy, epoxy or carboxyl at rings A and B as well on the side chain. These compounds are either produced by reactive oxygen species or by enzymatic reactions. The route of synthesis has influence on the biological effects of oxysterols, since compounds oxidized on rings A or/and B are implicated in toxic effects and the ones oxidized in the lateral chain are implicated in important biological roles influencing specific targets. Oxysterols are not cholesterol end-products since they exert metabolic activity on their own.

The role of oxysterols is discussed in atherosclerosis and in breast cancer, being highlighted as promoters of breast cancer (27-hydroxycholesterol) and as anticancer compounds (5,6-epoxycholesterol and the sulphated derivative and dendrogenin A).

The influence of Liver-X-Receptor is also established, since this nuclear receptor acts as a pawn in atherosclerosis and in cancer development, being influenced by the binding of agonists like oxysterols. Most oxysterols display antiproliferative properties in contrast with 27-hydroxycholesterol which is a pro-proliferative agent. This activity is debated in the present document.

The present work has the purpose to establish the role of oxysterols in different perspectives, as “good”, “bad” and “not so ugly” compounds, since besides having a negative role in cancer, oxysterols also have anticancer properties and have physiological properties as in the regulation of cholesterol metabolism.

**Keywords**

Cholesterol; Oxysterols; Atherosclerosis; Breast cancer; Liver-X-Receptors.

## Resumo

Os oxisteróis, derivados oxigenados do colesterol, são compostos com 27 carbonos estruturais substituídos por grupos polares como grupos hidroxilo, cetonas, hidroxiperóxi, epóxi ou carboxilo nos anéis A e B como também nas cadeias laterais. Estes compostos podem ser produzidos através de reações não enzimáticas, por espécies reativas de oxigênio ou por reações enzimáticas. A via de síntese tem influência nos efeitos biológicos dos oxisteróis, uma vez que oxisteróis oxidados nos anéis A e B têm efeitos tóxicos, enquanto que os que são oxidados nas cadeias laterais estão implicados em processos biológicos influenciando alvos específicos. Os oxisteróis não são produtos finais do colesterol, uma vez que apresentam atividade metabólica própria.

O papel dos oxisteróis é discutido sob o ponto de vista da aterosclerose e do cancro da mama, sendo destacado o seu efeito como promotores do cancro da mama (27-hidroxicolesterol) e como moléculas protetoras do desenvolvimento de cancro (5,6-epoxicolesterol e seu derivado sulfatado e denderogenina A).

A influência do *Liver-X-Receptor* é retratada, uma vez que este recetor nuclear atua como um peão no desenvolvimento da aterosclerose e do cancro, sendo influenciado por agonistas como os oxisteróis. A maior parte dos oxisteróis tem atividade anti-proliferativa quando se liga ao recetor, no entanto o 27-hidroxicolesterol apresenta a curiosa atividade proliferativa que é debatida no presente documento.

O presente trabalho tem por objetivo estabelecer o papel dos oxisteróis de acordo com diferentes perspetivas, compostos “bons”, “maus” e “não tão feios”, pois para além de terem um efeito negativo no cancro, também apresentam propriedades anticancerígenas e propriedades fisiológicas como a regulação do metabolismo do colesterol.

## Palavras-chave

Colesterol; Oxisteróis; Aterosclerose; Cancro da mama; *Liver-X-Receptor*.

## I. Introductory notes: oxysterols, synthesis and effects

Sterols, found in animals, plants and fungi are a group of natural lipids with important functions in vivo, such as physiological regulators, hormones and provitamines (SALVADOR *et al.*, 2013).

Cholesterol, a type of sterols, is present in lipid bilayers and is susceptible of oxidation (KULIG *et al.*, 2016). This oxidation process leads to oxysterols synthesis, which are cholestane-type steroids, with a 27-carbon scaffold (MUTEMBEREZI *et al.*, 2016) (VURUSANER *et al.*, 2016) substituted with polar groups such as hydroxyl, keto, hydroperoxy, epoxy or carboxyl at rings A and B, as well as at the side chain (KULIG *et al.*, 2016).

The synthesis of oxysterols can occur through either spontaneous/non-enzymatic processes or enzymatic processes. The way this process occurs, leads to differences in the oxysterols structure. If the process is non-enzymatic, through Reactive Oxygen Species (ROS), ozone, Ultra-Violet (UV) light, metal ions and other iron carrying proteins, oxysterol is polarized in the sterol ring system. On the other hand, if it occurs through an enzymatic reaction, the oxidation will be at the side chain and/or on the sterol ring system, depending on which tissue is involved (ZARROUK *et al.*, 2014) (KULIG *et al.*, 2016). These differences on the process of synthesis leads to different physicochemical properties, solubility or lipophilicity and action, such as cytotoxicity (KULIG *et al.*, 2016).

The synthetic route and the tissue where the process occurs will define which oxysterols are synthesized (Figure 1). Through a non-enzymatic route, which is dependent on ROS, different types of oxysterols are generated, such as  $7\alpha$ - or  $7\beta$ -hydroperoxide,  $7\alpha$ -hydroxycholesterol ( $7\alpha$ OHC),  $7\beta$ -hydroxycholesterol ( $7\beta$ OHC), 7-ketcholesterol (7-KC), 5,6-epoxycholesterol (5,6-EC) diastereomers, cholestane- $3\beta$ - $5\alpha$ - $6\beta$ -triol, cholestane- $3\beta$ - $5\alpha$ - $6\alpha$ -triol (CT) and  $7\alpha$ - and  $7\beta$ -hydroperoxycholesterol (ZARROUK *et al.*, 2014). Indeed, the double bond present at the ring B of the cholesterol molecule is a target for free radicals, so positions 4, 5, 6 and 7 have more tendency to be oxidized (VEJUX, A. *et al.*, 2008). Most of the non-enzymatic oxysterols present on the human body are obtained from the consumption of cholesterol rich food, such as dairy products, milk, eggs, meat products, storage fish and others (VEJUX, A. *et al.*, 2008). These products, rich in cholesterol, are subjected to radiation, high temperatures or cooked in the presence of oxygen, thus favouring a high rate of oxysterols formation. Once in the human body, oxysterols are more quickly absorbed than cholesterol and are transported through plasma in Low Density



Lipoprotein (LDL) and in a less extension in High Density Lipoprotein (HDL) and Very Low Density Lipoprotein (VLDL) and later metabolized by the liver (VEJUX, A. *et al.*, 2008).

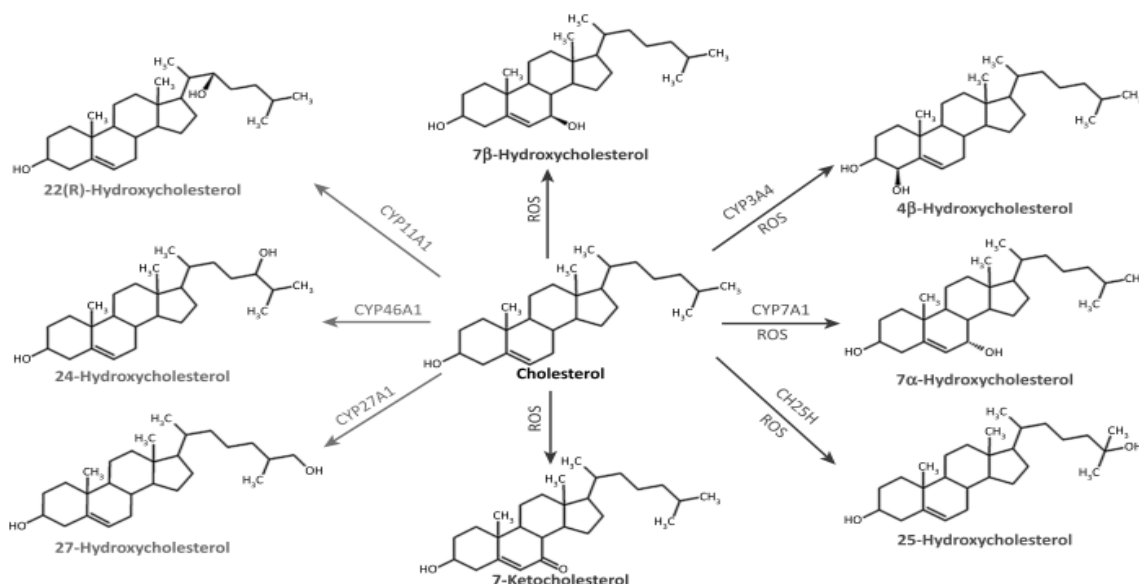
On the other hand, enzymatic oxysterols are obtained endogenously, through three groups of enzymes: oxidoreductases (CYP 450, cholesterol hydroxylase, hydroxysteroid dehydrogenase and squalene epoxidase), hydrolases (cholesterol epoxide hydrolase and cholesterol esterase) and transferases (hydroxysteroid sulfotransferase, Acyl-CoA cholesterol transferase and Lecithin cholesterol transferase) (MUTEMBEREZI *et al.*, 2016), producing 22 (R)-hydroxycholesterol (22(R)-OHC), 24-hydroxycholesterol (24-OHC) and 27-hydroxycholesterol (27-OHC), among others (KLOUDOVA *et al.*, 2017).

Some oxysterols can be synthesized by both reactions, as 4 $\beta$ -hydroxycholesterol (4 $\beta$ -OHC), 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (7 $\alpha$ -OHC) and 25-hydroxycholesterol (25-OHC) (KLOUDOVA *et al.*, 2017).

In a general mode, oxysterols oxidized in the rings A and B are implicated in toxic effects and oxysterols oxidized in the lateral chain play important biological roles through modulation of specific targets (GILL *et al.*, 2008) (OTAEGUI-ARRAZOLA *et al.*, 2010).

Although oxysterols are known for their bad effects as it is presented on the next chapter, oxysterols also have physiological functions in lower concentrations, as the regulation of cholesterol metabolism, influence on several signaling pathways, membrane fluidity and the activity of some membrane proteins (KLOUDOVA *et al.*, 2017).

Oxysterols have numerous molecular targets: cell membrane receptors, transport proteins and Nuclear Receptors (NR) (MUTEMBEREZI *et al.*, 2016). The effect on NR, the most studied targets of cholesterol precursors and metabolites, as Liver-X-Receptor (LXR), will be approached on the last chapter.



**Figure 1** - Biosynthesis of common oxysterols. Adapted from KLOUDOVA *et al.*, (2017).

## 2. Cytotoxicity of oxysterols

Oxysterols are not end products of metabolism, since they have pathologic effects mediated by alterations on the membrane properties or interaction with proteins (BUTTARI *et al.*, 2013), so they have a role in many pathologies as atherosclerosis, age related macular degeneration, Parkinson's and Alzheimer's disease, multiple sclerosis, osteoporosis, type 2 diabetes and in different types of cancer (KULIG *et al.*, 2016). Oxysterols contribute to the development of these pathologies because they are powerful immunomodulators influencing lymphocytes, Natural Killer (NK) cells and macrophages (VEJUX and LIZARD, 2009).

In lymphocytes, cholesterol is needed for their proliferation. However, oxysterols will prevent the *de novo* synthesis of cholesterol (OTAEGUI-ARRAZOLA *et al.*, 2010), and exert cytotoxic activity in lymphocytes, since cholesterol molecules on the membrane are replaced by oxysterols, thus altering the functions of plasma membrane (VEJUX and LIZARD, 2009). The lytic function of NK cells is affected by oxysterols since they also promote alteration in plasma membrane (VEJUX and LIZARD, 2009).

Besides having an effect on the immune system, oxysterols also influence metabolic chains. Oxysterols act on T resting cells activating transcription factor LXR $\beta$ , consequently activating ABCG1 transporter leading to the exit of cholesterol from the cells (BENSINGER *et al.*, 2008) (VEJUX and LIZARD, 2009). Also, in this cells, the activity of sterol regulatory binding protein (SREBP) is decreased due to oxysterols' activity, which has an impact on *de novo* synthesis and in the cholesterol uptake (BENSINGER *et al.*, 2008).

This chapter will focus specifically on the effect of oxysterols on the vascular wall and on tumoral cells.

## 2.1. Vascular wall

As it is well known, atherosclerosis is a slowly but progressive state of chronic inflammation of the vascular wall which starts with the accumulation of macrophages, lipids and smooth muscle cells, resulting in foam cells (VEJUX *et al.*, 2008) (VEJUX and LIZARD, 2009) (KULIG *et al.*, 2016). Those macrophages and smooth muscle cells die and become a cap with fat matter inside (VEJUX and LIZARD, 2009). This structure is a risk, because if it bursts it can lead to heart diseases as infarctus and strokes (VEJUX and LIZARD, 2009) (ZARROUK *et al.*, 2014) (KULIG *et al.*, 2016). The fate of the atherosclerotic lesion is dependent on the balance between recruiting and activation of macrophages subsets and also their clearance from the vessel wall and polarization state (BUTTARI *et al.*, 2014).

Oxidized LDL, which contain high levels of oxysterols, are the main responsible for the formation of the atherosclerotic plaque because of its cytotoxicity, along with pro-oxidative, pro-inflammation (LEMAIRE-EWING *et al.*, 2005) (VEJUX *et al.*, 2008) (VURUSANER *et al.*, 2016) and pro-fibrogenic (VURUSANER *et al.*, 2016) properties. Diverse studies show that some species of oxysterols have inflammatory and phospholipidosis inductor potential (VEJUX and LIZARD, 2009). Oxysterols, such as 7-ketocholesterol (7-KC), 7 $\alpha$ OHC, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ OHC), 24-OHC, 25-OHC, 27-OHC and cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol are the ones involved in the vascular degeneration (VEJUX and LIZARD, 2009) (ZARROUK *et al.*, 2014). According to OTAEGUI-ARRAZOLA *et al.* (2010), the analysis of fibrotic plaques removed from carotids demonstrate the presence of 27-OHC, 7-KC and 7 $\beta$ -OHC.

Oxysterols are present in different stages of atherosclerosis development since they can act on the endothelial dysfunction, inducing inflammation and the production of M1 and M2 subsets of macrophages, as well as phospholipidosis and lipid accumulation. Furthermore, oxysterols influence *vasa vasorum* angiogenesis and promote cell through apoptosis or autophagy (ZARROUK *et al.*, 2014)

Macrophages play a major role in this inflammatory process (BUTTARI *et al.*, 2013) (BUTTARI *et al.*, 2014) (ZARROUK *et al.*, 2014). They act in different stages of atherosclerosis plaque development: ingestion of lipoproteins and their accumulation giving rise to foam cells containing lipid droplets to the inflammation and progression of the plaque as macrophages are trapped in the lesion. Furthermore, macrophages are involved in local

inflammatory response by secreting pro-inflammatory cytokines, chemokines and ROS and the death of macrophages, which contributes to the necrotic core in progressing plaques (BOBRY SHEV *et al.*, 2016).

Macrophages can be classified in two types: M1 and M2. M1 (pro-inflammatory), which are the set classically activated (BUTTARI *et al.*, 2014) (SCHULMAN, 2017), are stimulated by Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Lipopolysaccharide (LPS), Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) and Granulocyte-Macrophage Colony - Stimulating Factor (GM-CSF) (BUTTARI *et al.*, 2013) and are the leading source of ROS and nitrous oxide (NO) in atherosclerotic plaque (BUTTARI *et al.*, 2014) (BOBRY SHEV *et al.*, 2016); and M2 (alternative macrophages or anti-inflammatory) (BUTTARI *et al.*, 2014) (SCHULMAN, 2017) are only activated when IL-4, IL-10, IL-13 and Macrophage Colony - Stimulating Factor (M-CSF) (BUTTARI *et al.*, 2013). M2 are a group of cells with anti-inflammatory properties that are critical for the resolution of inflammation (BUTTARI *et al.*, 2014). M1 subtype is present in progressing plaques contrary to M2 subtypes which is present in regressing plaques involved in tissue repair (BOBRY SHEV *et al.*, 2016).

The most abundant autoxidation cholesterol product, 7-KC (Figure 1), is present in large concentrations on atherosclerotic lesions, which contributes to the plaque development in different stages of the pathology, before and after plaque formation (ZARROUK *et al.*, 2014). Formerly to the lesion formation, 7-KC promotes alterations including the inhibition of vascular elasticity, since in the presence of 7-KC there is an overproduction of superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ ) which inhibits the synthesis of NO, a potent relaxing agent. Instead of the production of NO, the synthesis of the cytotoxic agent  $NO_3^-$  takes place (ZARROUK *et al.*, 2014). Moreover, 7-KC, 7 $\alpha$ OHC and 7 $\beta$ OHC (Figure 1) induce the inflammation of endothelial cells and contribute to a better adhesion of molecules to the vascular wall, which leads to a greater concentration of neutrophils to the sub-endothelium (ZARROUK *et al.*, 2014).

7-KC also affects macrophages polarization by disrupting M1/M2 balance to a pro-inflammatory state (BUTTARI *et al.*, 2014) and pro-atherogenic, affecting both phenotype and function (BUTTARI *et al.*, 2013). It promotes the conversion of an anti-inflammatory state promoted by M2 to a pro-inflammatory and pro-atherogenic state promoted by M1 (BUTTARI *et al.*, 2014).

Besides phenotype changes, subtypes differ in the synthesis of cytokines, chemokines, proteases and other mediators (BUTTARI *et al.*, 2014). Macrophages are a significant source

of Matrix Metalloproteins (MMP) and pro- and anti-inflammatory cytokines (BUTTARI *et al.*, 2013) (BUTTARI *et al.*, 2014). These cytokines regulate extracellular matrix remodeling, inflammatory cell recruitment and activation and vascular smooth muscular cell proliferation and apoptosis, which favour progression of atherosclerosis and facilitate an unstable phenotype (BUTTARI *et al.*, 2013) (BUTTARI *et al.*, 2014).

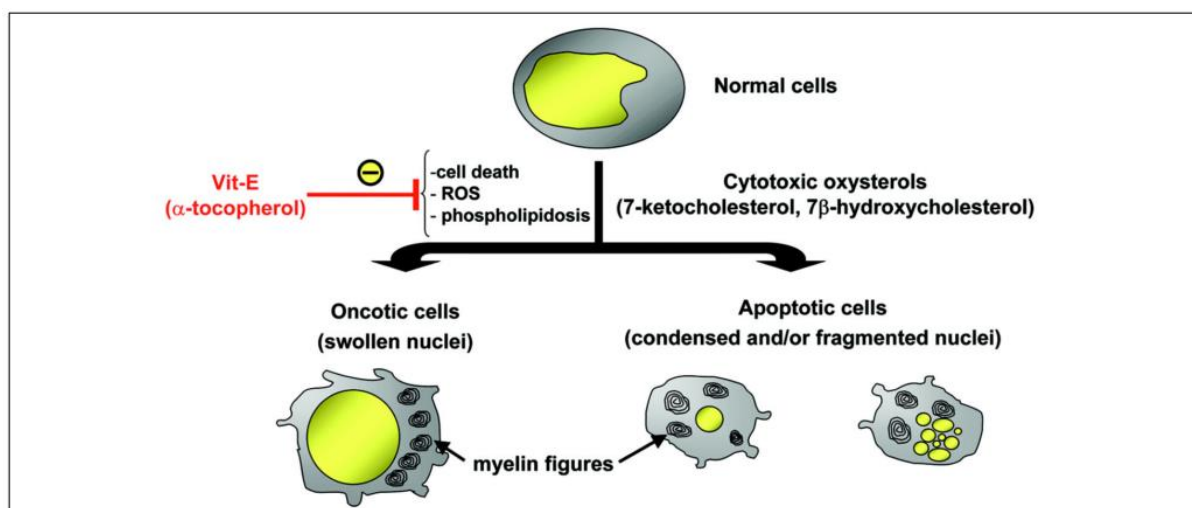
MMP are proteases which degrade the cell matrix, affecting the vascular remodeling and plaque vulnerability (BUTTARI *et al.*, 2013) (VACEK *et al.*, 2015). In normal conditions, M1 are the ones who synthesize more MMPs. However, in the presence of 7-KC, the subtype M2 has an augmented production of MMPs, contributing to the pro-inflammatory effects of oxysterols (BUTTARI *et al.*, 2013) (BUTTARI *et al.*, 2014). This oxysterol increases the production of MMP-9, which polarize the two subsets of macrophages into the production of MMP-2 (BUTTARI *et al.*, 2014).

The synthesis of cytokines is greater in the presence of 7-KC, which leads to an augmented synthesis of endothelium adhesion molecules, proteases and other mediators (BUTTARI *et al.*, 2013) or in other words, contribute to the synthesis of pro-atherogenic mediators involved in a pro-inflammatory, pro-invasive and pro-angiogenic mechanisms (BUTTARI *et al.*, 2014). When 7-KC is present, M1 is stimulated to increase the production of TNF- $\alpha$  and IL-6 (BUTTARI *et al.*, 2013). TNF- $\alpha$  and IL-6 polarize M2 to produce these two cytokines and also IL-12 (BUTTARI *et al.*, 2014). It has been reported that 7-KC also influence the secretion of inflammatory and immunomodulatory chemokines as IL-8, Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Chemokine C-C Motif Ligand-3 (CCL-3), CCL-4 and growth factors as Granulocyte Colony - Stimulating Factor (G-CSF), GM-CSF and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) which are responsible for the recruitment of leukocytes into the inflammation site and stimulate endothelial cell migration, spreading and neovessel formation thus promoting the angiogenesis associated to the progression of the atherosclerotic plaque (BUTTARI *et al.*, 2014).

Phospholipidosis is another effect promoted by oxysterols which translates in lipid imbalance (ZARROUK *et al.*, 2014). It has been reported that 7-KC, 7 $\beta$ OHC and 5,6-epoxycholesterol (5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC) cause some cell modifications, which promote phospholipidosis such as the presence of multilamellar cytoplasmic structures, named myelin figures, intracellular accumulation of polar lipids as phospholipids (VEJUX and LIZARD, 2009), mainly phosphatidylcholine and sphingomyelin in acidic compartments (OTAEGUI-ARRAZOLA *et al.*, 2010), loss of transmembrane mitochondrial potential and reversibility of polar lipid

accumulation (VEJUX *et al.*, 2008) (VEJUX and LIZARD, 2009). Myelin figures result from the accumulation of phospholipids leading to structures with different shapes and sizes (VEJUX and LIZARD, 2009). This lipid imbalance, induced by oxysterols and some cationic amphiphilic drugs as amiodarone, imipramide, fluoxetine, chlorcyclizine, tamoxifen and gentamicin (VEJUX and LIZARD, 2009), can be a defense system for cells as myelin figures retain xenobiotics and later suffer exocytosis to reduce the concentration of them (VEJUX and LIZARD, 2009), being considered an adaptive response rather than a toxic one (VEJUX and LIZARD, 2009). Besides this effect on the defense system, phospholipidosis' effects are mainly associated to cell death as it inhibits cell proliferation, activates caspase-mediated apoptosis in cell culture and might encourage the release of some proteolytic enzymes which activate certain apoptotic pathways (VEJUX and LIZARD, 2009).

It has been shown that the most powerful molecule capable of counteracting the effects of oxysterol induced side-effects, namely 7-KC and 7 $\beta$ OHC (Figure 1), at high level in oxLDL and in atheromatous plaque is vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) (VEJUX and LIZARD, 2009) (ZARROUK *et al.*, 2014) (Figure 2) so the balance between oxysterols and vitamin E might play an important role in the lipid profile in the atherosclerotic lesions and on its progression (VEJUX and LIZARD, 2009).



**Figure 2** - Effects of vitamin E on 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol induced cell death (Adapted from VEJUX *et al.* (2008)).

BUTTARI *et al.* (2014) studied the effect of resveratrol in counteracting the effect of 7-KC in disrupting the balance between M1/M2 macrophage subsets. This well-known antioxidant and anti-inflammatory natural phenolic compound has immunomodulatory and anti-inflammatory activities in M1 and M2 in the presence of 7-KC (BUTTARI *et al.*, 2014). Resveratrol improves the endocytosis activity of M2, having no effect on neither M1 nor not

stimulated macrophages, preventing MMP-9 and MMP-2 production in both subsets, preventing the production of TNF- $\alpha$  and IL-6 by M1 and thus preventing polarization of M2 and preventing the synthesis of the above mentioned chemokines (BUTTARI *et al.*, 2014). Resveratrol may be a potential therapeutic compound to contradict 7-KC effects (BUTTARI *et al.*, 2014).

## 2.2. Tumoral Cells

Carcinogenesis is a pathologic process related to inflammation (KULIG *et al.*, 2016), which not only occurs because of genetic and environmental factors, such as a high lipid dietary intake, but also can be influenced by the presence of oxysterols, especially the ones obtained by autoxidation (ZARROUK *et al.*, 2014).

Oxysterols can modify the cancer risk in various ways, since they can influence carcinogenesis either through their procancerous and proproliferative role or through their anticancer effect due to proapoptotic and cytotoxic activities (WEILLE *et al.*, 2013) (KLOUDOVA *et al.*, 2017).

The procancerous and proproliferative role of oxysterols occurs through different mechanisms and pathways, as interference with cholesterol homeostasis (through control of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA (HMG-CoA)), intracellular lipid transfer and the transmission of intra and extra cellular signals, like the Hedgehog and wnt signaling pathways (WEILLE *et al.*, 2013) (KLOUDOVA *et al.*, 2017).

Oxysterols are known for their mutagenic and genotoxic potentials, since they promote DNA damage, induct cyclooxygenase-2 expression and stimulate tumor cell migration (KULIG *et al.*, 2016). So, these oxidation products of cholesterol are known for a role in many types of cancer such as colon, lung, skin, breast, prostate and bile ducts (KULIG *et al.*, 2016).

Their proapoptotic and cytotoxic effects on tumoral cells are due to the overproduction of ROS, changes of the calcium level in cells or modifications in the mitochondrial membrane (VEJUX and LIZARD, 2009) (OTAEGUI-ARRAZOLA *et al.*, 2010) (KLOUDOVA *et al.*, 2017). Anticancer effects, are promoted by 5,6-epoxycholesterol (5,6-EC) and its derivatives, as sulphated 5,6-epoxycholesterol (5,6-ECS) and Dendrogenin A (DDA).

In the next chapter, the role of oxysterols in breast cancer is approached, on one hand as cancer promoters (27-OHC) and on the other hand as anticancer compounds (5,6-EC and derivatives and DDA.)

### 3. Breast cancer

According to *Liga Portuguesa contra o cancro* (LIGA PORTUGUESA CONTRA O CANCRO, 2015)<sup>5</sup>, every year in Portugal 6000 cases of Breast cancer (BC) are detected and 1% correspond to male BC. 1500 women die with this pathology, being the second cause of death by cancer in Portugal (LIGA PORTUGUESA CONTRA O CANCRO, 2015).

BC causes are multifactorial, including environmental, genetic (RAZA *et al.*, 2015) and hormonal factors. Many of these risk factors are linked to estrogens. Indeed, the risk is increased by early menarche, late menopause and obesity in postmenopausal women (KEY *et al.*, 2001). The higher the concentration of endogenous estradiol, the higher the risk of BC (KEY *et al.*, 2001). Current therapies, including hormone therapies, face the challenges of endocrinal resistance and recurrence of BC, since these therapies only diminish the concentrations of estrogens not affecting the concentrations of other promoters of BC as oxysterols (RAZA *et al.*, 2015).

In the case of postmenopausal women, usually their body weight is increased. Since they have lower production of ovarian estrogen, the estrogen is obtained through the metabolism of cholesterol present in the adipose tissue (VRIELING *et al.*, 2010). In this line of thought, it was showed that women taking statins have a lower risk of having BC associated with high levels of cholesterol/ adipose tissue (NELSON *et al.*, 2013) (RAZA *et al.*, 2015) (MARWARHA *et al.*, 2017).

Cholesterol is a key factor in the development of cancers, since cancer cells have upregulated *de novo* synthesis of cholesterol, modulating signaling pathways responsible for proliferation and survival, as 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, leading to a perpetual feed-forward cycle (MARWARHA *et al.*, 2017). Rather than cholesterol, which has no effect in modulating the activity of signal transduction cascades, oxysterols are responsible for the mentioned results (MARWARHA *et al.*, 2017).

---

<sup>5</sup> Accessed on 03/06/2017



### 3.1. Oxysterols as promoters of cancer

27-OHC (Figure 1) is the main endogenous oxysterol obtained by the conversion of cholesterol through the cytochrome P450 enzyme CYP27A1 (sterol 27-hydroxylase), via the acidic bile acid synthesis pathway (DUSELL *et al.*, 2008). 27-OHC is a substrate for bile acid synthesis, but when it is in excess it is conducted to be catabolized by CYP7B1 (Oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase) (RAZA *et al.*, 2015).

There are three clinical conditions in which 27-OHC concentration is elevated: post-menopausal period, hypercholesterolemia and obesity (WU *et al.*, 2013). All these three conditions combined increase the circulating insulin and the insulin like growth factors, the local production of estrogens and influence of adipokines and inflammatory cytokines involved in the disease pathogenesis (NELSON *et al.*, 2014).

This oxysterol is present in high concentration in the vasculature where its role is well known (DUSELL *et al.*, 2008). It is also known that macrophages can infiltrate on the mammary tissue, conducting to the synthesis of estrogenic oxysterols, as 27-OHC (DUSELL *et al.*, 2008). The effects of estrogenic molecules occur through the Estrogen Receptor (ER),  $\alpha$  subtype, controlling the growth of BC (WU *et al.*, 2013). WU *et al.* (2013) showed 27-OHC exert its affect through the ER. Noteworthy, in the presence of an ER antagonist, 27-OHC does not have such effects. So, 27-OHC acts as a partial agonist promoting the proliferation of ER+ BC (WU *et al.*, 2013) (RAZA *et al.*, 2015), but not the proliferation of normal breast cells (RAZA *et al.*, 2015). 27-OHC has been classified as an endogenous Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) (DUSELL *et al.*, 2008) (WU *et al.*, 2013) (RAZA *et al.*, 2015). The concentration of 27-OHC is the same either in serum or in breast tissue both in healthy or in BC patients, demonstrating that the promotion of BC occurs through local mechanisms (WU *et al.*, 2013). The two enzymes formerly named are implicated in the metabolism of 27-OHC. CYP27A1 has the same expression in healthy or BC patients, the difference occurs in the expression of CYP7B1, the enzyme responsible for the conversion of 27-OHC in other oxysterols (WU *et al.*, 2013). When the expression of CYP7B1 is low, more 27-OHC is accumulated promoting the cell replication in breast tissue in an autonomous manner (WU *et al.*, 2013). In a patient where the expression of CYP7B1 is low, the survival rate is also low (WU *et al.*, 2013).

RAZA *et al.* (2015) have shown that the action of 27-OHC occurs through the action of tumor suppressing protein, p53 and Mouse Double Minute 2 protein (MDM2). p53 senses cellular stress and acts through the promotion of the cell cycle arrest, cellular senescence or

apoptosis (HARRIS and LEVINE, 2005) (RAZA *et al.*, 2015) and it is regulated by MDM2, an E3 ubiquitin ligase (RAZA *et al.*, 2015). In similarity to WU *et al.* (2013), RAZA *et al.* (2015) studied the promotion in Michigan Cancer Foundation-7 (MCF7) cells, which express p53 wild type. 27-OHC decreases p53 activity and protein levels and increases the interaction between p53 and MDM2, since when 27-OHC binds to the ER, MDM2 binds p53 shuttle it to cytoplasm for degradation (RAZA *et al.*, 2015). Since p53 will not have an active effect, it will contribute to breast cancer cells proliferation (RAZA *et al.*, 2015). Contrary to 27-OHC, estradiol has no effect on p53 activity (RAZA *et al.*, 2015).

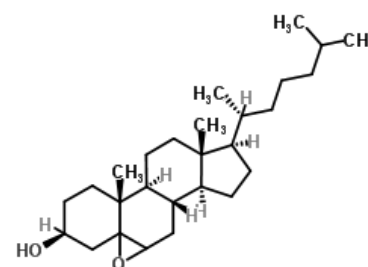
The use of tamoxifen and aromatase inhibitors does not influence the concentration of 27-OHC, since hormone therapy is designed to reduce estrogens levels only (RAZA *et al.*, 2015) and this molecule is nonaromatized so it is not influenced by aromatase inhibitors (WU *et al.*, 2013).

WU *et al.* (2013) also tested other oxysterols, as 25-OHC, 22R-OHC and 7-KC. The only oxysterol that showed a similar activity to 27-OHC was 25-OHC, but it was not so potent in the ER activation (WU *et al.*, 2013).

### 3.2. Oxysterols as anticancer compounds

Tamoxifen (TAM) is a cytostatic drug (MEDINA *et al.*, 2011) which blocks the mitogenic properties of  $\alpha$  isoforms of ER in BC (MEDINA *et al.*, 2011) (SEGALA *et al.*, 2013) by competing with  $17\beta$ -estradiol (SEGALA *et al.*, 2013). This drug is used as an adjuvant for the recurrence of cancer and as a therapy to extend patient' lives (MEDINA *et al.*, 2011) (SEGALA *et al.*, 2013). Besides having affinity to the ER, TAM also has affinity to the Microsomal Antiestrogen Binding Site (AEBS) which has two enzymes responsible for the epoxide hydrolase activity (ChEH):  $3\beta$ -hydroxysterol- $\Delta^8$ - $\Delta^7$ -isomerase (D8D7I), the catalytic subunit, and  $3\beta$ -hydroxysterol- $\Delta^7$ -reductase (DHCR7), the regulatory subunit (MEDINA *et al.*, 2011) (SILVENTE-POIROT and POIROT, 2012) (MEDINA *et al.*, 2013) (SEGALA *et al.*, 2013). D8D7I and DHCR7 are implicated in cholesterol biosynthesis, cell differentiation and cell death (MEDINA *et al.*, 2013).

ChEH is the enzyme responsible for trans-hydration of  $5,6\alpha$ -

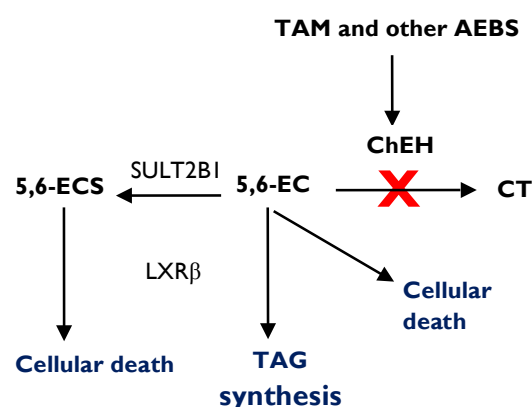


**Figure 3** - 5,6 – epoxycholesterol.  
Adapted from CHEMSPIDER (2017a).

EC and 5,6 $\beta$ -EC into cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) (MEDINA *et al.*, 2011) (MEDINA *et al.*, 2013) (SEGALA *et al.*, 2013). CT shows mutagenic activity when it is in the presence of ROS, so it is pro-cancer endogenous molecule (MEDINA *et al.*, 2011) (SEGALA *et al.*, 2013).

The interaction AEBS/ChEH leads to the intracellular accumulation of free cholesterol precursors, due to a non-competitive binding to the AEBS site: TAM, clomifene, nitromifene, PBPE, ring-B oxysterols and raloxifene contribute to the accumulation of cholest-8-en-3 $\beta$ -ol (zymostenol), while PBPE and tesmilifene lead to accumulation of cholest-5,7-dien-3 $\beta$ -ol (7-dehydrocholesterol) and finally, 4-OH-TAM leads to accumulation of cholest-5,24-dien-3 $\beta$ -ol (desmosterol) (MEDINA *et al.*, 2009). The competitive inhibition of ChEH leads to the accumulation of the 5,6-EC diastereomers (SEGALA *et al.*, 2013). The growing concentration of AEBS ligands, as TAM and oxysterols, control cell growth, cell differentiation leading to the apoptosis of cancer cells.

Besides the accumulation of cholesterol precursors, the AEBS ligands can also induce the production of ROS. In the case of 5,6-EC (Figure 3), NAD(P)H oxidase (NOX) induces the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> which is converted into hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (SEGALA *et al.*, 2013). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the responsible for the production of 5,6-EC as major cholesterol oxidation results (SEGALA *et al.*, 2013).



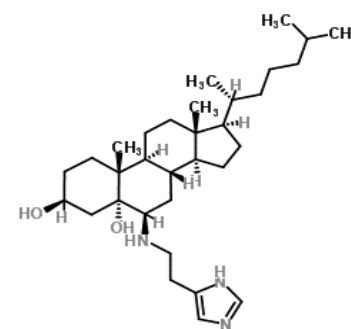
**Figure 4** - Mechanism of cytotoxicity and biosynthesis of TAG promoted by 5,6-EC and 5,6-ECS.

SEGALA *et al.* (2013), beyond studying 5,6-EC anticancer properties, also showed that when ChEH is inhibited, the Sulfotransferase (SULT) 2BI6 enzyme converts 5,6-EC into a sulphated derivative, 5,6-ECS. Both species have influence on the LXR $\beta$  (MEDINA *et al.*, 2013), but the promoted effects are different, since 5,6-EC promotes triacylglycerol (TAG) synthesis and 5,6-ECS promotes cell death (Figure 4) (SEGALA *et al.*, 2013).

The cytotoxicity promoted by 5,6-EC and its sulphated derivative also differ. 5,6-ECS promotes cytotoxicity dependent on SULT2BIb and LXR- $\beta$ , whereas the cytotoxicity of 5,6-EC cytotoxicity is controlled by Bcl2 (SEGALA *et al.*, 2013).

MEDINA *et al.* (2013), have studied another metabolite derivative from 5,6-EC: the Dendrogenin A (DDA), shown in Figure 5. The group characterized DDA in a cancer

process and explored its activities. DDA is a steroidal alkaloid formed in mammalian tissues, resulting from the combination of 5,6-EC and histidine (His), though an aminolysis reaction (GRIFFITHS *et al.*, 2016), at the level of AEBS which binds 5,6-EC and His (MEDINA *et al.*, 2013) (GRIFFITHS *et al.*, 2016). Although it is known that the reaction occurs through AEBS, the responsible enzyme is unknown (MEDINA *et al.*, 2013). MEDINA *et al.* (2013) proved DDA is a selective and competitive inhibitor of ChEH, do not have activity on ER so it does not present the secondary



**Figure 5** - Dendrogenin A. Adapted from CHEMSPIDER (2017b).

effects of TAM, as endometrial cancer. DDA in *in vitro* studies displayed the induction of tumor cell re-differentiation and death of various tumoral cells (MEDINA *et al.*, 2013).

In BC tissues the concentration of DDA is lower than in normal breast tissues suggesting DDA biosynthesis is downregulated during carcinogenesis (MEDINA *et al.*, 2013).

As it was evidenced before, the cholesterol metabolism is involved in development, aggressiveness and resistance to cancer treatments while cholesteryl fatty acid esters, CT metabolites, biliary acids, HDL and LDL, estrogens and androgens can behave as tumor promoters (MEDINA *et al.*, 2013). However, 5,6-EC and its derivatives, 5,6-ECS and DDA reveal anticancer properties, since they promote redifferentiation and cellular death of tumor cells (MEDINA *et al.*, 2013).

#### **4. Liver-X-Receptor**

##### **4.1. Liver-X-Receptor and Nuclear Receptor family**

Nuclear receptors (NR) are a superfamily of DNA-binding proteins (OAKLEY and CIDLOWSKI, 2010) that control cell growth, embryonic development and metabolism, (SCHULMAN, 2010) (TRAVERSARI and RUSSO, 2012), namely of cholesterol, bile acid and fatty acid (OAKLEY and CIDLOWSKI, 2010), and cell death (DAWSON and XIA, 2012), mostly through ligand-dependent transcription factors as lipophilic hormones, vitamins, dietary lipids and other intracellular signals (SONODA *et al.*, 2008) (KRASOWSKI *et al.*, 2011). This family, encoded by 48 genes (SCHULMAN, 2010), works through co-activators and co-receptors in order to regulate gene expression (KRASOWSKI *et al.*, 2011).

As depicted in Figure 6, NR share a conserved domain structure inserted in a N-terminus to a C-terminus (KRASOWSKI *et al.*, 2011): variable N-terminal A/B domain, highly conserved DNA-Binding Domain (DBD) – region C, a hinge region – region D and a C-terminal Ligand-

Binding Domain (LBD) – region E (SONODA *et al.*, 2008) (OAKLEY and CIDLOWSKI, 2010) (KRASOWSKI *et al.*, 2011) (SOLT and BURRIS, 2012) (GERMAIN and BOURGUET, 2013). There are also two activation sites, the AF-1 which is in the N-terminal domain being ligand independent and the AF-2 which is located in the LBD being ligand dependent (OAKLEY and CIDLOWSKI, 2010). The NR share a five or six domains of homology (GERMAIN and BOURGUET, 2013). These different regions have different functions: the DBD is the most highly conserved domain and encodes two zinc finger modules; LBD is less conserved and mediates the ligand binding, dimerization and AF-2 is a ligand dependent transactivation function; Moreover, the A/B region contains a -cell and a -promoter specific transactivation function, AF-2 (GERMAIN and BOURGUET, 2013). The F region it is not always present (GERMAIN and BOURGUET, 2013).



**Figure 6** - General structure of Nuclear Receptors (NR). Adapted from SLADEK (2011).

SONODA *et al.* (2008) subdivide the NR into subtypes according to their physiologic ligand and potential functions: Endocrine Receptors, like the glucocorticoid receptor; orphan receptors OR which are the receptors where no specific ligand has been identified so far, as Retinoid-X-Receptor (RXR); and adopted orphan receptors as Liver-X-Receptor (LXR), Farnesoid-X-Receptor (FXR) and Pregnane-X-Receptor (PXR).

As proper metabolic control requires a balance between opposite pathways (SCHULMAN, 2010), disorders in these systems can lead to diseases (SLADEK, 2011) as infertility, obesity, diabetes and cancer (OAKLEY and CIDLOWSKI, 2010).

LXR is involved in the metabolism of cholesterol, more specifically in the metabolism of oxysterols (SONODA *et al.*, 2008) (KRASOWSKI *et al.*, 2011). To exert their activity, they form permissive heterodimers with Retinoid-X-Receptors (RXR).

LXR will be presented through this chapter since they are implicated in cholesterol metabolism and consequently in pathologies as atherosclerosis and cancer. RXR will be presented not as an orphan receptor but as a partner of these receptors.

## 4.2. Retinoid-X-Receptor contribution to Liver-X-Receptor activity

Retinoid-X-Receptor (RXR) is an orphan receptor, since when it was discovered no natural ligands were found (SONODA *et al.*, 2008) (DAWSON and XIA, 2012) and even now RXR natural ligands still are a controversial theme (DAWSON and XIA, 2012). Not only RXR can act as homodimers, this receptor also has the ability of forming heterodimers with other NR as LXR, FXR and PXR (SONODA *et al.*, 2008) (DAWSON and XIA, 2012) (ROSZER *et al.*, 2013) and the activity of these receptors is highly dependent on RXR, since it has an impact in NR partner responses (DAWSON and XIA, 2012).

Three different heterodimers can be formed: non-permissive, conditionally permissive and permissive (ROSZER *et al.*, 2013). In the case of the receptors in study, the heterodimers are permissive since the agonist can bind either to one of the NR or to both of them, contrary to non-permissive whereas the agonist has to be specific of NR partner where RXR acts as the “silent” partner (DAWSON and XIA, 2012) (ROSZER *et al.*, 2013).

## 4.3. Liver-X-Receptor: properties and heterodimer formation

Oxysterols, obtained enzymatically or/and by ROS, are the natural ligands of LXR (TRAVERSARI and RUSSO, 2012) (BOVENGA *et al.*, 2015). LXR is the sensor for oxysterols and is critical for cholesterol homeostasis (TOBIN and FREEDMAN, 2006) (SONODA *et al.*, 2008) (KRASOWSKI *et al.*, 2011) (TRAVERSARI *et al.*, 2014), since he regulate lipids and cholesterol homeostasis through different targets as ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1), ABCG1, ABCG5, ABCG8, Apolipoprotein E (Apo E) and SREBP-1c which, in turn, regulates cholesterol efflux and fatty acid and triglyceride synthesis, steroidogenesis, glucose homeostasis, contributing for a role in immunity and inflammation (TRAVERSARI and RUSSO, 2012) (HUANG, 2014) (SCHULMAN, 2017). KRAKOWSKI *et al.* (2011) highlighted the role of LXR as regulator of uterine contractility and of the pathway involved in tumorigenesis and embryonic development.

LXR can be present in two isoforms, specifically LXR  $\alpha$  (NR1H3), expressed in liver, adipose tissue, adrenal glands, intestine, lungs, cells of myelomonocytic lineage, as macrophages (KRASOWSKI *et al.*, 2011) (TRAVERSARI and RUSSO, 2012) (TRAVERSARI *et al.*, 2014) kidney (SCHULMAN, 2010) and spleen (TOBIN and FREEDMAN, 2006) (KRASOWSKI *et al.*, 2011), and LXR  $\beta$  (NR1H2) which is expressed ubiquitously (TOBIN and FREEDMAN, 2006) (SCHULMAN, 2010) (KRASOWSKI *et al.*, 2011) (TRAVERSARI and

RUSSO, 2012) (TRAVERSARI *et al.*, 2014). However, MAQDASY *et al.* (2016) admit that some cell types may express both of LXR isoforms.

As it was stated before, in order to have activity, RXR has to form a permissive heterodimer with LXR and this heterodimer binds to LXR response elements (LXREs)– a DNA represented by two 5'-AGGTCA-3' hexameric half sites separated by a four nucleotide spacer, DR4 motif (BOVENGA *et al.*, 2015), a sequence in the regulatory region of target genes together with co-repressors (BONAMASSA and MOSCHETTA, 2013) (HUANG, 2014). When ligands, as oxysterols and synthetic compounds, bind to LXR or RXR, co-repressors are released and co-activators are recruited resulting in gene-transcription (BONAMASSA and MOSCHETTA, 2013) (HUANG, 2014) (BOVENGA *et al.*, 2015). However there is an exception: LXR acts as a monomer to regulate the transcription of renin encoding gene (MAQDASY *et al.*, 2016).

#### **4.4. Liver-X-Receptor and lipid homeostasis**

How does LXR control lipid homeostasis? When LXR is activated by oxysterols or synthetic ligands, the intestinal, hepatic and macrophage transcriptional regulation of genes is influenced, lowering cholesterol overload occurring through the regulation of Reverse Cholesterol Transport (RCT), intestinal cholesterol absorption and excretion in feces (BONAMASSA and MOSCHETTA, 2013). RCT is promoted through ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8, Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) contributing to the efflux and bodily excretion of excess cellular cholesterol (FESSLER, 2017).

RCT begins in hepatocytes and enterocytes, where ABCA-1 dependent lipidation Apo A1 generates nascent pre- $\beta$  high density lipoprotein, HDL particles (FESSLER, 2017). HDL and lipid free Apo A1 act as plasma acceptors for excess cholesterol, acting along with HDL to induce cholesterol efflux from macrophages, facilitated by ABCA1 and ABCG1 (FESSLER, 2017). To clear HDL particles from plasma, there are three main mechanisms: Scavenger Receptor B Type I (SRBI) which mediates cholesterol uptake by hepatocytes, CETP which facilitates the transfer of cholesterol from HDL to VLDL and LDL, followed by LDL clearance via Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) and ApoB 100 is cleared from plasma by enterocytes to intestinal lumen pathway (FESSLER, 2017). LXR, when saturated, also blocks cellular cholesterol uptake by increasing LDLR via Inducible Degradation of the LDLR (IDOL) (MAQDASY *et al.*, 2016). The remaining VLDL particles return to plasma or complete RCT pathway by being excreted in the form of free cholesterol to the biliary tract or directly into intestine by ABCG5/ABCG8 or as bile acids (FESSLER, 2017). In the

intestine, another circuit can influence reabsorption of cholesterol, which is Niemann-Pick CI-Like I protein (NPC1L1) (MAQDASY *et al.*, 2016) (FESSLER, 2017). LXR activation decreases NPC1L1 levels which decreases the absorption of cholesterol and the absorbed one goes through RCT cycle again (MAQDASY *et al.*, 2016) (FESSLER, 2017). On one hand, NPC1L1 is downregulated but on the other hand ABCG5 and ABCG8 are upregulated (FESSLER, 2017). The hypercholesterolemic action at various stages, the regulation at RCT, the increase in cholesterol excretion and the prevention of its accumulation in the peripheral tissues as macrophages and arterial wall, overall contribute to LXR anti-atherogenic properties, making LXR a good pharmaceutical target (MAQDASY *et al.*, 2016) However, not everything is positive concerning the role of this receptor, since if LXR  $\alpha$  is stimulated, it will regulate fatty acid synthesis by the modulation of SREBP-1c, fatty acid synthase (FAS), Stearoyl-CoA Desaturase (SCD-1) (MAQDASY *et al.*, 2016) (FESSLER, 2017) and carbohydrate responsive element-binding protein, inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia (MAQDASY *et al.*, 2016) (FESSLER, 2017). According to FESSLER (2017) both LXR genes are needed for maximum atheroprotective activity, since in mice where LXR  $\alpha$  gene is deleted, RCT is compromised and atherosclerosis is increased, although SCHULMAN (2017) adds that in LXR  $\alpha$  knocked down mice, if LXR  $\beta$  is stimulated by powerful agonists, it completely or partially compensates the absence of LXR  $\alpha$ .

#### 4.5. Liver-X-Receptor and anti-inflammatory activity

As many other NR (glucocorticoid and retinoic acid receptor), LXR shows anti-inflammatory activity (FESSLER, 2017) (SCHULMAN, 2017).

Transrepression is an anti-inflammatory mechanism where there is no need to bind DNA in order to exert such effect (SCHULMAN, 2017). When LXR is activated by agonists, SUMOylation<sup>6</sup> of LXR occurs and it is recruited to repress genes present on the pro-inflammatory gene promoters, through a SUMO-dependent interaction between LXR and Coronin (CORO) 2A (SCHULMAN, 2017). This interaction prevents the release of co-repressors, decreasing pro-inflammatory gene expression (SCHULMAN, 2017). However, in LXR null macrophages carrying mutations for the SUMOylation sites, the anti-inflammatory activity is not affected. Thus SUMOylation of LXR is not the factor for anti-inflammatory activity, whilst if Nuclear Co-Repressor (NCOR) I is knockdown in macrophages, inflammation is decreased since ABCA1 and fatty acid synthesis genes are upregulated

---

<sup>6</sup> Post translational modification involving the attachment of a small ubiquitin-related modifier (SUMO) proteins to specific lysine residues in target proteins, thereby regulating different aspects of protein function as transcription, subcellular location, DNA repair and cell cycle (MAEJIMA and SADOSHIMA, 2014).



(SCHULMAN, 2017). This upregulation leads to the synthesis of long chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) with anti-inflammatory properties as palmitoleic acid, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) (SCHULMAN, 2017). Moreover, when LPS is present, an *in vitro* interesting activity is observed: in the beginning of inflammation, fatty acid synthesis is transiently inhibited, then with the inflammation process going on, it is activated having a role in the inflammation course (OISHI *et al.*, 2017) (SCHULMAN, 2017). The composition of phospholipids is also affected, since LXR modulates the expression of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase (LPCAT) 3, an enzyme that remodel phospholipids by exchanging fatty acids by long-chain PUFA (HASHIDATE-YOSHIDA *et al.*, 2015) (SCHULMAN, 2017). The combination of long-chain PUFA synthesis and LPCAT 3 activity contributes to a decrease in inflammation by regulating kinase activation through changes in membrane and for lowering the availability of common membrane fatty-acids for inflammatory mediator production (SCHULMAN, 2017). ABCA1 adds its anti-inflammatory activity since it removes free cholesterol from cells which alters plasma membrane organization and consequently disrupts the inflammatory signal (SCHULMAN, 2017).

Macrophages are also influenced by LXR, since this NR promotes the synthesis of anti-inflammatory acids, stimulates the efflux of free cholesterol and organization of membranes via ABCA1 and LPCAT3. The expression of ABCA1 stimulates IL10 and arginase 1 and 2 (markers of M2 subtype) which polarizes toward M2 macrophage phenotype (SCHULMAN, 2017). Moreover, LXR regulates the cell surface receptor Mer photo-oncogene tyrosine kinase (MERKT) having a role in inflammation resolution (SCHULMAN, 2017).

#### **4.6. Liver-X-Receptor and cancer**

Cholesterol is recognized as a necessity for cell growth and proliferation (BENSINGER *et al.*, 2008) which is positive in normal situations but in cancer scenarios is not beneficial since it promotes cancer cells replication.

Having in consideration the role of LXR, an antiproliferative role has been attributed to this receptor, since it alters the tumor metabolism and microenvironment, disrupting key growth pathways and activating apoptotic processes (BOVENGA *et al.*, 2015).

BENSINGER *et al.* (2008) performed LXR studies in lymphocyte T, an adaptive immune cell, in order to understand how lipid metabolism influences lymphocyte T responses. LXR has a role in cell-cycle arrest, regulating the transition of G1 to S phase, and this occurs through sterols transporters ABCA1 and ABCG1, transcription factors as SREBP and through

enzyme SULT2BI (BENSINGER *et al.*, 2008). ABCG1 prevents proliferation since it promotes sterol efflux or redistribution, leading to a localized depletion of sterols (BENSINGER *et al.*, 2008). ABCG1 expression stimulates SREBP-2 activity through the distribution of sterols (BENSINGER *et al.*, 2008). When LXR agonist are absent, ABCA1 and ABCG1 are downregulated, in contrast with what is observed when an agonist is present, ABCG1 are upregulated (BOVENGA *et al.*, 2015). LXR has an independent mechanism through SULT2BI when T cell receptor (TCR) is activated, which transfers sulphate groups to oxysterols, inactivating them as LXR ligands which culminates in an increase in cell proliferation (BENSINGER *et al.*, 2008) (NELSON *et al.*, 2014). SULT2BI-LXR-ABCG1 axis couples cellular cholesterol metabolism and proliferation which gives an understanding in how lipid role and regulation is relevant in rapid dividing cells (BENSINGER *et al.*, 2008) (BOVENGA *et al.*, 2015).

In BC, when LXR is upregulated, it inhibits proliferation on human BC cells, regulates cell cycle and lipogenic genes in MCF7 cell line, and has an antiproliferative effect independent from lipogenic activity (VEDIN *et al.*, 2009). It was proved that LXR antiproliferative effects are more pronounced in ER+ cell lines, which indicates that ER have a role in the antiproliferative action (VEDIN *et al.*, 2009). Moreover, LXR has an impact in cell cycle arrest since VEDIN *et al.* (2009) observed that S-phase associated kinase protein-2 (SKp2) (BOVENGA *et al.*, 2015), Cyclin A2 (CCNA 2) and Cyclin D1 (CCND 1) are downregulated, inhibiting the progression of G1 to S phase cell cycle in SKp2 (BOVENGA *et al.*, 2015) CCNA 2 (NCBI, 2017a) and CCND 1 (NCBI, 2017b), and also G2/M in CCNA 2 (NCBI, 2017a). Moreover, LXR has the ability to induce the expression of Tumor Suppressor Protein p 53 and Retinoblastoma (Rb) Protein which is also a tumor suppressor (VEDIN *et al.*, 2009).

The role of lipid biosynthesis and cell proliferation are linked, since when SREBP-1c is knocked down, it was reported that lower proliferation occurred in MCF-7 cells (VEDIN *et al.*, 2009).

NGUYEN-VU *et al.* (2013) studied the effect of LXR activation on E2F2, a transcription factor. The group found that in ER+ breast lines, E2F2 is downregulated which translates in lower proliferation rate.

As it was presented before, 27-OHC has an important role in tumor progression. Besides being a SERM it is also an LXR agonist (NELSON *et al.*, 2014) (MARWARHA *et al.*, 2017). 27-OHC role is confusing since if it activates LXR, it should not stimulate cell proliferation

since it reduces intracellular cholesterol (NELSON *et al.*, 2014). MARWARHA *et al.* (2017) argue that 27-OHC is dependent on ER<sup>+</sup> to promote primary tumor growth and dependent on LXR to promote metastasis. The involvement of LXR promoted by 27-OHC leads to Epithelial-to-Mesenchymal Transitions (EMT) (MARWARHA *et al.*, 2017) (SHEN *et al.*, 2017) adopting a spindle like morphology (NELSON *et al.*, 2013). In MET I cells (ER<sup>-</sup> and LXR<sup>+</sup>), 27-OHC promotes BC and also lung metastasis (NELSON *et al.*, 2013) (MARWARHA *et al.*, 2017).

SHEN *et al.* (2017) studied the increasing effect of 27-OHC in promoting an invasive and migratory potential of immortalized BC cells in an ER and LXR independent manner, through Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) 3. It has been observed that STAT-3 increases C-Myc (proto-oncogene), VEGF, Cyclin D1, MMP2 and MMP9, contributing to tumor proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis (SHEN *et al.*, 2017).

According to SHEN *et al.* (2017), 27-OHC has two independent manners to promote invasive/migratory potential: (1) Classically activating ER  $\alpha$  in ER<sup>+</sup> cancers and (2) STAT-3/MMP9 and STAT-3/EMT in ER<sup>+</sup> and ER<sup>-</sup> BC cells.

Taken together, these studies show that 27-OHC acts as a primary biochemical link between lipid metabolism and cancer, being a harmful compound specially in menopause patients (SHEN *et al.*, 2017).

## 5. Final considerations

Oxysterols, resulting from enzymatic reactions or ROS, are not end products of cholesterol metabolism since they present their own activities, for example in atherosclerosis and in cancer. In atherosclerosis, oxysterols have an important role in the progression of the pathology acting in different stages of the development, as it was mentioned for 7-KC, since it has significant activities before and after plaque formation.

Statins are an efficient therapy since they block HMG-CoA preventing the synthesis of cholesterol but also other essential isoprenoids compounds as farnesyl and geranyl proteins. Since oxysterols are the main responsible for atherosclerotic plaque, an effective therapy could interfere with oxysterols biosynthesis rather than HMG-CoA biosynthetic route, by lowering the concentration of atherogenic oxysterols or by targeting LXR since it has antiatherogenic and anti-inflammatory properties.

The present work highlighted the role of oxysterols in breast cancer since this is an increasingly common cancer with an elevated morbidity and mortality specially among post-menopausal women. The current therapy is not that effective being responsible for many cases of breast cancer recurrence.

Oxysterols are recognized as promoters of cancer, specially 27-OHC which has activity on ER and on LXR. In ER, subtype  $\alpha$ , 27-OHC induces only the proliferation of cancer cells, being contemplated two mechanisms: (1) inhibiting CYP7B1 and (2) influencing p53. Both mechanisms will promote breast cancer cells proliferation. There is a gap in the current therapy since tamoxifen and other aromatase inhibitors currently used in ER + breast cancer only has activity in estrogens, not considering oxysterols.

However, oxysterols do not only have a “bad” side, since some oxysterols were identified with potential anticancer effects, as 5,6-EC and its sulphated derivate, 5,6-ECS. Both species have influence on  $\beta$  subunit of Liver-X-Receptor (LXR $\beta$ ) but the promoted effects are different, since 5,6-EC promotes triacylglycerol (TAG) synthesis and 5,6-ECS promotes cell death. DDA, another derivative of 5,6-EC also presents anticancer properties and besides is a selective inhibitor of ChEH, not exerting activity on ER.

LXR is the sensor for oxysterols and is critical for all body cholesterol homeostasis since it regulates lipids and cholesterol homeostasis, regulating cholesterol efflux and fatty acid and triglyceride synthesis, steroidogenesis, glucose homeostasis, having a role in immunity and inflammation. Considering the different effects promoted by LXR, this receptor has an important role in atherosclerosis and cancer.

As it was mentioned before, 27-OHC has importance in the development of cancer and his activity on LXR appears to be contrary to other LXR agonists, since it promotes the tumor proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis.

In the case of breast cancer, the actual therapy does not cover every need in cancer resolution, since recurrence occurs often. Lowering the levels of oxysterols with affinity to the ER or using LXR agonists that promote an antiproliferative effect could be an alternative effective treatment.

**Bibliography**

BENSINGER, S. J.; JOSEPH, S. B.; ZELCER, N.; JANSSEN, E. M.; HAUSNER, M.; SHIH, R.; PARKS, J. S.; EDWARDS, P. A.; JAMIESON, B. D.; TONTONOZ, P. - LXR Signaling Couples Sterol Metabolism to Proliferation in the Acquired Immune Response. **Cell**. 134: 1 (2008) 97–111.

BOBRY SHEV, Y. V.; IVANOVA, E. A. ; CHISTI AKOV, D. A.; NIKIFOROV, N. G.; OREKHOV, A. N. - Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. **BioMed Research International**. 2016. (2016).

BONAMASSA, B.; MOSCHETTA, A. - Atherosclerosis: lessons from LXR and the intestine. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 24: 3 (2013) 120–128.

BOVENGA, F.; SABBÀ, C.; MOSCHETTA, A. - Uncoupling Nuclear Receptor LXR and Cholesterol Metabolism in Cancer. **Cell Metabolism**. 21. (2015) 517–526.

BUTTARI, B.; SEGONI, L.; PROFUMO, E.; D'ARCANGELO, D.; ROSSI, S.; FACCHIANO, F.; BUSINARO, R.; IULIANO, L.; RIGANÒ, R. - 7-Oxo-cholesterol potentiates pro-inflammatory signaling in human M1 and M2 macrophages. **Biochemical Pharmacology**. 86: 1 (2013) 130–137.

BUTTARI, B.; PROFUMO, E.; SEGONI, L.; D'ARCANGELO, D.; FACCHIANO, F.; SASO, L.; BUSINARO, R.; IULIANO, L.; RIGANÒ, R. - Resveratrol counteracts inflammation in human M1 and M2 macrophages upon challenge with 7-oxo-cholesterol: Potential therapeutic implications in atherosclerosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2014. (2014).

CHEMSPIDER - **5,6-Epoxycholesterol** [Online] [Accessed 8 ago. 2017]. a] Available <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4955622.html?rid=6fbf416e-41c6-4d95-ad95-821cd8646d5d>

CHEMSPIDER - **Dendrogenin A** [Online] [Accessed 8 ago. 2017]. b]. Available in <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7982249.html?rid=750b3e10-6021-436a-8272-8ad83327431d>

DAWSON, M. I.; XIA, Z. - The retinoid X receptors and their ligands. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**. 1821: 1 (2012) 21–56.

DUSELL, C. D. et al. - 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Selective Estrogen Receptor Modulator. **Molecular Endocrinology**. 22: 1 (2008) 65–77.

FESSLER, M. B. - The challenges and promise of targeting the Liver X Receptor for treatment of inflammatory disease. **Pharmacology & Therapeutics**. (2017).

GERMAIN, P.; BOURGUET, W. - **Dimerization of Nuclear Receptors**. In: CONN, P. M. *Methods in Cell Biology*. : Elsevier Inc., 2013, ISBN: 978-0-12-408143-7. 1. ed., Vol. 117, 21–41.

GILL, S.; CHOW, R.; BROWN, A. J. - Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: The oxysterol hypothesis revisited and revised. **Progress in Lipid Research**. 47: 6 (2008) 391–404.

GRIFFITHS, W. J.; ABDEL-KHALIK, J.; HEARN, T.; YUTUC, E.; MORGAN, A. H.; WANG, Y. - Current trends in oxysterol research. **Biochemical Society transactions**. 44: 2 (2016) 652–8.

HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. - The p53 pathway: positive and negative feedback loops. **Oncogene**. 24: 17 (2005) 2899–2908.

HASHIDATE-YOSHIDA, T.; HARAYAMA, T.; HISGHIKAWA, D.; MORIMOTO, R.; HAMANO, F.; TOKUOKA, S. M.; ETO, M.; TAMURA-NAKANO, M.; YANOBU-TAKANASHI, R.; MUKUMOTO, Y.; KIYONARI, H.; OKAMURA, T.; KITA, Y.; SHINDOU, H.; SHIMIZU, T. - Fatty acyl-chain remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. **eLife**. 2015: 4 (2015) 1–75.

HUANG, C. - Natural modulators of liver X receptors. **Journal of integrative medicine**. 12: 2 (2014) 76–85.

KEY, T. J.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. - Epidemiology of breast cancer. **The Lancet oncology**. 2: 3 (2001) 133–140.

KLOUDOVA, A.; GUENGERICH, F. P.; SOUCEK, P. - The Role of Oxysterols in Human Cancer. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. 28: 7 (2017) 485–496.

KRASOWSKI, M. D.; NI, A.; HAGEY, L. R.; EKINS, S. - Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 334: 1–2 (2011) 39–48.

KULIG, W.; CWIKLIK, L.; JURKIEWICZ, P.; ROG, T.; VATTULAINEN, I.- Cholesterol oxidation products and their biological importance. **Chemistry and Physics of Lipids**. 199. (2016) 144–160.

LEMAIRE-EWING, S; PRUNET, C.; MONTAGE, T.; VEJUX, A.; BERTHIER, A.; BESSÈDE, G.; CORCOS, L.; GAMBERT, P.; NÉEL, D.; LIZARD, G.- Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. **Cell Biology and Toxicology**. 21: 2 (2005) 97–114.

LIGA PORTUGUESA CONTRA O CANCRO - **Cancro da mama** [Online] [Accessed. 3 jun. 2017]. Available in <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama/>

MAEJIMA, Y.; SADOSHIMA, J. - SUMOylation a novel protein quality control modifier in the heart. **Circulation Research**. 115: 8 (2014), 686–689.

MAQDASY, S.; TROUSSON, A.; TAUVERON, I.; VOLLE, D. H.; BARON, S.; LOBACCARO, J. M. A. - Once and for all, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  are gatekeepers of the endocrine system. **Molecular Aspects of Medicine**. 49. (2016) 31–46.

MARWARHA, G.; RAZA, S.; HAMMER, K.; GHRIBI, O. - 27-hydroxycholesterol: A novel player in molecular carcinogenesis of breast and prostate cancer. **Chemistry and Physics of Lipids**. (2017).

MEDINA, P.; PAILLASE, M. R.; SÉGALA, G.; KHALLOUKI, F.; BRILLOUET, S.; DALENC, F.; COURBON, F.; RECORD, M.; POIROT, M.; SILVENT-POIROT, S. - Importance of cholesterol and oxysterols metabolism in the pharmacology of tamoxifen and other AEBS ligands. **Chemistry and Physics of Lipids**. 164: 6 (2011) 432–437.

MEDINA, P.; PAILLASE, M. R.; SÉGALA, G.; VOISIN, M.; MHAMDI, L.; DALENC, F.; LACROIX-TRIKI, M.; FILLERON, T.; PONT, F.; SAATI, T. A.; MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D.; SILVENT-POIROT, S.; POIROT, M. - Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. **Nature Communications**. 4: 1840 (2013) 1–10.

MEDINA, P. DE; SILVENTE-POIROT, S.; POIROT, M. - Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. **Autophagy**. 5: 7 (2009) 1066–1067.

MUTEMBEREZI, V.; GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCCIOLI, G. G. - Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. **Progress in Lipid Research**. 64. (2016) 152–169.

NCBI - **CCNA2 cyclin A2 [ Homo sapiens (human) ]** [Online] [Accessed 8 ago. 2017]. a]. Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/890>

NCBI - **CCND1 cyclin D1 [ Homo sapiens (human) ]** [Online] [Accessed 8 ago. 2017]. b]. Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/595>

NELSON, E. R.; WARDELL, S. E.; JASPER, J. S.; PARK, S.; SUCHINDRAN, S.; HOWE, M. K.; CARVER, N. J.; PILLAI, R. V.; SULLIVAN, P. M.; SONDHAI, V.; UMETANI, M.; GERADTS, J.; MCDONNELL, D. P. - 27-Hydroxycholesterol Links Hypercholesterolemia and Breast Cancer Pathophysiology. **Science**. 342: 6162 (2013) 1094–1098.

NELSON, E. R.; CHANG, C. Yi; MCDONNELL, D. P. - Cholesterol and breast cancer pathophysiology. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 25: 12 (2014) 649–655.

NGUYEN-VU, T.; VEDIN, L. L.; LIU, K.; JONSSON, P.; LIN, J. Z.; CANDELARIA, N. R.; CANDELARIA, L. P.; ADDANKI, S.; WILLIAMS, C.; GUSTAFSSON, J. A.; STEFFENSEN, K. R.; LIN, C. Y.- Liver x receptor ligands disrupt breast cancer cell proliferation through an E2F-mediated mechanism. **Breast Cancer Res**. 15: 3 (2013) 1–12.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. - **Nuclear Receptors**. In **Media** [Online] Available from <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-90-481-3303-1>. ISBN 978-90-481-3302-4, 63–89.

OISHI, Y.; SPANN, N. J.; LINK, V. M.; MUSE, E. D.; STRID, T.; EDILLOR, C.; KOLAR, M. J.; MATSUZAKA, T.; HAYAKAWA, S.; TAO, J.; KAIKKONEN, M. V.; CARLIN, A. F.; LAM, H. T.; MANABE, I.; SHIMANO, H.; SAGHATELIAN, A.; GLASS, C. K. - SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. **Cell Metabolism**. 25: 2 (2017) 412–427.

OTAEGUI-ARRAZOLA, A.; MENÉNDEZ-CARREÑO, M.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. - Oxysterols: A world to explore. **Food and Chemical Toxicology**. 48: 12 (2010) 3289–3303.

RAZA, S.; OHM, J. E.; DHASARATHY, A.; SCHOMMER, J.; ROCHE, C.; HAMMER, K. D. P.; GHRIBI, O. - The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol regulates p53 activity and



increases cell proliferation via MDM2 in breast cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 410: 1–2 (2015) 187–195.

ROSZER, T.; MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M. P.; CEDENILLA, M.; RICOTE, M. - Retinoid X receptors in macrophage biology. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 24: 9 (2013) 460–468.

SALVADOR, J. A R.; CARVALHO, J. F. S.; NEVES, M. A. C.; SILVESTRE, S. M.; LEITÃO, A. J.; SILVA, M. M. C.; MELO, M. L. S.- Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. **Natural product reports**. 30: 2 (2013) 324–74.

SCHULMAN, I. G. - Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 62: 13 (2010) 1307–1315.

SCHULMAN, I. G. - Liver X receptors link lipid metabolism and inflammation. **FEBS Letters**. (2017) 1–14.

SEGALA, G.; MEDINA, P.; IULIANO, L.; ZERBINATI, C.; PAILASSE, M. R; NOGUER, E.; DALENC, F.; PAYRÉ, B.; JORDAN, V. C.; RECORD, M.; SILVENT-POIROT, S.; POIROT, M. - 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of Tamoxifen in breast cancer cells. **Biochemical Pharmacology**. 86: 1 (2013) 175–189.

SHEN, Z.; ZHU, D.; LIU, J.; CHEN, J.; LIU, Y.; HU, C.; LI, Z.; LI, Y.- 27-Hydroxycholesterol induces invasion and migration of breast cancer cells by increasing MMP9 and generating EMT through activation of STAT-3. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 51. (2017) 1–8.

SILVENTE-POIROT, S.; POIROT, M. - Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. **Current Opinion in Pharmacology**. 12: 6 (2012) 696–703.

SLADEK, F. M. - What are Nuclear Receptor Ligands. **Moll Cell Endocrinol**. 334: 1-2 (2011) 3–13.

SOLT, L. A.; BURRIS, T. P. - Action of RORs and their ligands in (patho)physiology. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 23: 12 (2012) 619–627.

SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. - Nuclear receptors: Decoding metabolic disease. **FEBS Letters**. 582: 1 (2008) 2–9.

TOBIN, J. F.; FREEDMAN, L. P. - Nuclear receptors as drug targets in metabolic diseases: new approaches to therapy. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 17: 7 (2006) 284–290.

TRAVERSARI, C.; SOZZANI, S.; STEFFENSEN, K. R.; RUSSO, V. - LXR-dependent and -independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth. **European Journal of Immunology**. 44: 7 (2014) 1896–1903.

TRAVERSARI, C.; RUSSO, V. - Control of the immune system by oxysterols and cancer development. **Current Opinion in Pharmacology**. 12: 6 (2012) 729–735.

VACEK, T. P.; REHMAN, S.; NEAMTU, D.; YU, S.; GIVIMANI, S.; TYAGI, S. C. - Vascular Health and Risk Management Dovepress Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. **Vascular Health and Risk Management**. 11. (2015) 173–183.

VEDIN, L. L.; LEWANDOWSKI, S. A.; PARINI, P.; GUSTAFFSON, J. Å.; STEFFENSEN, K. R. - The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. **Carcinogenesis**. 30: 4 (2009) 575–579.

VEJUX, A.; LIZARD, G. - Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. **Molecular Aspects of Medicine**. 30: 3 (2009) 153–170.

VEJUX, A.; MALVITTE, L.; LIZARD, G. - Side effects of oxysterols: Cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 41: 7 (2008) 545–556.

VURUSANER, B.; LEONARDUZZI, HG.; GAMBA, P.; POLI, G.; BASAGA, H. - Oxysterols and mechanisms of survival signaling. **Molecular Aspects of Medicine**. 49. (2016) 8–22.

WEILLE, J. DE; FABRE, C.; BAKALARA, N. - Oxysterols in cancer cell proliferation and death. **Biochemical Pharmacology**. 86: 1 (2013) 154–160.

WU, Q.; ISHIKAWA, T.; SIRIANNI, R.; TANG, H.; MCDONALD, J. G.; YUHANNA, I. S.; THOMPSON, B.; GIRARD, L.; MINEO, C.; BREKKEN, R. A.; UMETANI, M.; EUHUS, D. M.; XIE, Y.; SHAUL, P. W. - 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. **Cell Reports**. 5: 3 (2013) 637–645.

ZARROUK, A.; VEJUX, A.; MACKRILL, J.; O'CALLAGHAN, Y.; HAMMAMI, H.; O'BRIEN, N.; LIZARD, G. - Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. **Ageing Research Reviews**. 18. (2014) 148–162.